

Aus dem Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Identifizierung neuer Tumorprogressionsgene in MMTV- induzierten BALB/c⁺-Mammakarzinomen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Melanie Alexandra Kimm
aus München
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. C. A. Klein
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Neupert Prof. Dr. H.L. Sommer Prof. Dr. St. K. Bohlander
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	09.07.2007

Meinen Eltern, Natascha, Patricia und Henning.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Theodorou V., Kimm M., Boer M., Wessels L., Theelen W., Jonkers J. and Hilkens J. (2007): Identification of Novel Genes, Gene families and Pathways Involved in Mammary Cancer by MMTV-Insertional Mutagenesis. *Nature Genetics*, 2007 Juni, 39 (6); 759-69

Kimm M, Theodorou V., Boer M. and Hilkens J. (2007): Activation of *Wnt3a* in Mouse Mammary Tumors by Insertional Mutagenesis and Expression Analysis of Wnt Genes in Mouse Mammary Tumors and Human Breast Cancers. Eingereicht zur Publikation.

Danksagung

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Labor von Dr. John Hilkens am Niederländischen Krebsforschungsinstitut (NKI) in Amsterdam (Die Niederlande) und im labor von Dr. Christoph Klein am Institut für Immunologie LMU) in München durchgeführt. Für die Aufgabenstellung, sein fortwährendes Interesse am Projekt und seine Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei John und Christoph bedanken; darüber hinaus für die Möglichkeit an zahlreichen Konferenzen und Praktika teilzunehmen.

Prof. Dr. Anton Berns und Dr. Jos Jjonkers für die Betreuung und ergiebigen Diskussionen.

Meinen Kolleginnen Vasso Theodorou und Mandy Boer für die Hilfe und Motivation.

Weiterhin allen Kollegen von H4, Sebastian Ulbert, Britta Weigelt, Oliver Weichenrieder und Menno Creyghton.

Den Kollegen aus der AG Klein in München, insbesondere Andrea Eberhardt, Bernhard Polzer und Nicole Wendler.

Meinen Freunden Martina, Anuschka, Niko und Hans.

Meinen Eltern, meinen Schwestern Natascha und Patricia, sowie meinem Freund Henning.

Finanzielle Förderung

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden zu erheblichen Teilen aus Fördermitteln der Vereniging Koningin Wilhelmina Fond (KWF) finanziert (Förderkennzeichen 2001-2489).

INHALT

VERÖFFENTLICHUNGEN	IV
DANKSAGUNG	V
FINANZIELLE FÖRDERUNG	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
EINLEITUNG	1
I. Das Mammakarzinom	1
1. Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
2. Entwicklung der Mamma	1
3. Unterschiede zwischen humaner und muriner Mamma	3
4. Klassifizierung des Mammakarzinoms	4
II. Induktion von Mammatumoren in der Maus	4
1. Inzucht-Mausstämme mit hoher Tumorrates	4
2. Infektionsübertragung von MMTV	5
3. Retrovirale Insertionsmutagenese	6
III. Aktivierung von Signalwegen in Mammatumoren	8
1. Gene und Signalwege in Mammatumoren	8
2. <i>Wnt</i> -Gene und -Signalwege	11
4. Wnt-Signalwege in der Brustentwicklung und in Mammatumoren	12
ZIELSETZUNG	14

MATERIAL UND METHODEN	15
I. Material	15
1. Feinchemikalien	15
2. Enzyme	15
3. Puffer	15
4. Nukleotide	16
5. Oligonukleotide	16
6. Radionukleotide	17
7. Vektoren	17
8. Medien	17
9. Seren und Medien für die Zellkultur	17
10. Bakterienstämme	18
II. Methoden	19
1. BALB/c ⁺ -Mausmodell	19
2. Humanes Gewebe	19
3. Zelllinien	19
4. DNA-Isolierung	20
5. RNA-Isolierung	20
6. Southern Blot	20
7. Northern Blot	21
8. cDNA-Synthese	22
9. Splinkerette-PCR	22
10. PCR und Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	23
11. Quantitative PCR (qPCR)	24
12. Herstellung retroviraler Konstrukte	24
13. Transduktion von HC11-Zellen	24
14. Proliferationsassay	25
15. Soft Agar Assay	25
16. Transplantation transduzierter HC11-Zellen <i>in vivo</i>	25
17. Immunohistochemie	25
18. Statistik	25

ERGEBNISSE	26
I. Neue Tumorprogressionsgene in MMTV-induzierten BALB/c⁺-Mammatumoren	26
1. Etablierung eines neuen Mausmodells - die BALB/c ⁺ -Maus	26
2. Southern Blot Analyse der BALB/c ⁺ -Tumore	29
3. Etablierung einer Hochdurchsatzanalyse	30
4. Identifizierung neuer MMTV-Integrationsstellen	32
II. Analyse von <i>Wnt3a</i> in murinen und humanen Mammatumoren	36
1. Der <i>Wnt3a</i> -Genlocus als neue CIS	36
2. <i>Wnt3a</i> -Expression in Tumoren mit MMTV-Integration im <i>Wnt3a</i> -Genlocus	37
3. <i>Wnt3a</i> transformiert HC11-Mamma-Epithelzellen <i>in vitro</i>	39
4. <i>Wnt3a</i> -Expression erhöht die Tumorigenität von HC11-Zellen <i>in vivo</i>	42
5. <i>Wnt1</i> -, <i>Wnt3</i> - und <i>Wnt3a</i> -Expression in MMTV-induzierten Mammatumoren	48
6. <i>WNT3a</i> -Expression in Brustkrebs-Zelllinien und Brustkarzinomen	51
DISKUSSION	54
I. Identifizierung neuer Tumorprogressionsgene	54
II. Die Rolle von <i>Wnt3a</i> in der Tumorigenese von Mammatumoren	57
1. Aktivierung von <i>Wnt3a</i> durch MMTV	57
2. Expressionsanalyse von <i>Wnt1</i> , <i>Wnt2</i> , <i>Wnt3</i> , <i>Wnt3a</i> und <i>Wnt10b</i> in Maus-Mammatumoren	57
3. <i>Wnt3a</i> ist ein potentiell Onkogen	58
4. Die Funktion von <i>WNT3a</i> in einer Untergruppe humaner Brustkarzinome	61
ZUSAMMENFASSUNG	62
LITERATURVERZEICHNIS	64
ERKLÄRUNG	A
LEBENS LAUF	B

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum
CIS	<i>Common Integration Site</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dATP	2'-Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
env	Hüllprotein
ÖR	Östrogenrezeptor
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FCS	fetales Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
gag	gruppenspezifisches Antigen
h	Stunde
ISH	<i>In Situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
Min.	Minute(n)
MuLV	<i>Murine Leukaemia Virus</i>
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer-Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pol	Polymerase
RIS	<i>Retroviral Integration Site</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
SAG	Superantigen
Sek.	Sekunde(n)
sog.	sogenannt(e)
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit
U3	<i>unique 3' sequence</i>
U5	<i>unique 5' sequence</i>
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
u.U.	unter Umständen

Einleitung

I. Das Mammakarzinom

1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einer Neuerkrankungsrate von ca. 1 Millionen Frauen pro Jahr das am häufigsten vorkommende Malignom bei Frauen der westlichen Welt. Alleine in Deutschland verzeichnet man jährlich 47.000 Frauen, die mit einem Brusttumor diagnostiziert werden, davon etwa 19.000 im Alter unter 60 Jahren (Statistisches Bundesamt, 2004). Das Mammakarzinom ist für knapp 26% aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen und für mehr als ein Drittel (36%) der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002). Durch Verbesserung in der Vorsorge (z.B. durch Mammographie) ist vor allem die Zahl der gutartigen (benignen) Tumore gestiegen. Die trotzdem gleich bleibende Zahl der Neuerkrankungen an einem malignen Tumor über die letzten Jahre ist dadurch zu erklären, dass Vorstufen besser erkannt und behandelt werden und nicht zu einer bösartigen Form auswachsen.

2. Entwicklung der Mamma

Die Mamma entsteht bereits früh in der Embryonalentwicklung als Verdickung des Ektoderms (Milchleiste), die sich bis zur Geburt als Knospen (Milchknospen) manifestiert. Erst unter dem Einfluss von Sexualhormonen während der Pubertät entwickelt sich das Gewebe weiter. Hierbei kommt es zu der charakteristischen Ausprägung eines stark verzweigten und verästelten Gangsystems (Ductus lactiferi), das in das angrenzende Mesenchym und Fettgewebe der Brust wächst. Um die eigentliche Funktion der Mamma zu erhalten (Milchproduktion für die Nachkommen), werden während der Schwangerschaft verstärkt verästelte Seitenzweige und Alveoli gebildet, die schließlich das gesamte Fettgewebe ausfüllen (Abbildung 1). Als funktionelle Einheit, von der die Differenzierung ausgeht, dienen die terminalen Endknospen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auch pluripotente Stammzellen enthalten. Das Gangsystem besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen epithelialen Zelltypen, den luminalen und den myoepithelialen Zellen (Abbildung 2). Die luminalen Zellen begrenzen den gangbildenden Hohlraum und sekretieren während der Stillzeit Milchproteine. Die myoepithelialen Zellen separieren die luminalen Zellen von der Basalmembran und können sich, aufgrund ihres hohen Gehalts an Aktin, kontrahieren und dadurch die Milch in den Ductus lactiferus leiten. Die Ductus sind in ein mesenchymales Stroma eingebettet, das mit dem Fettgewebe in Kontakt steht. Für die zyklisch wiederkehrende Differenzierung und Involution der Mamma sind vor allem die Sexualhormone verantwortlich.

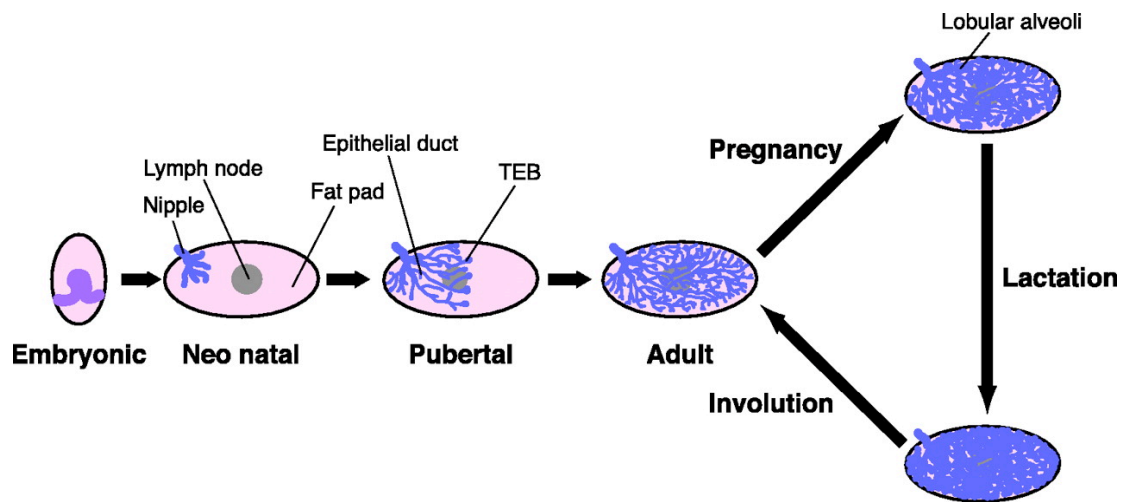


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Mamma-Entwicklung in der Maus. Während der Pubertät beginnt, ausgehend von den TEBs, das Auswachsen des Epitheliums in das Fettgewebe. In der Schwangerschaft kommt es zu einer stärkeren Verzweigung und Verdickung der Alveoli, die in der Stillzeit ihren Höhepunkt erreicht. Während der Involution bildet sich das Gewebe zurück und entspricht wieder dem Zustand vor der Schwangerschaft. (nach Wiseman B.S. und Werb Z., 2002). TEB = terminal end bud

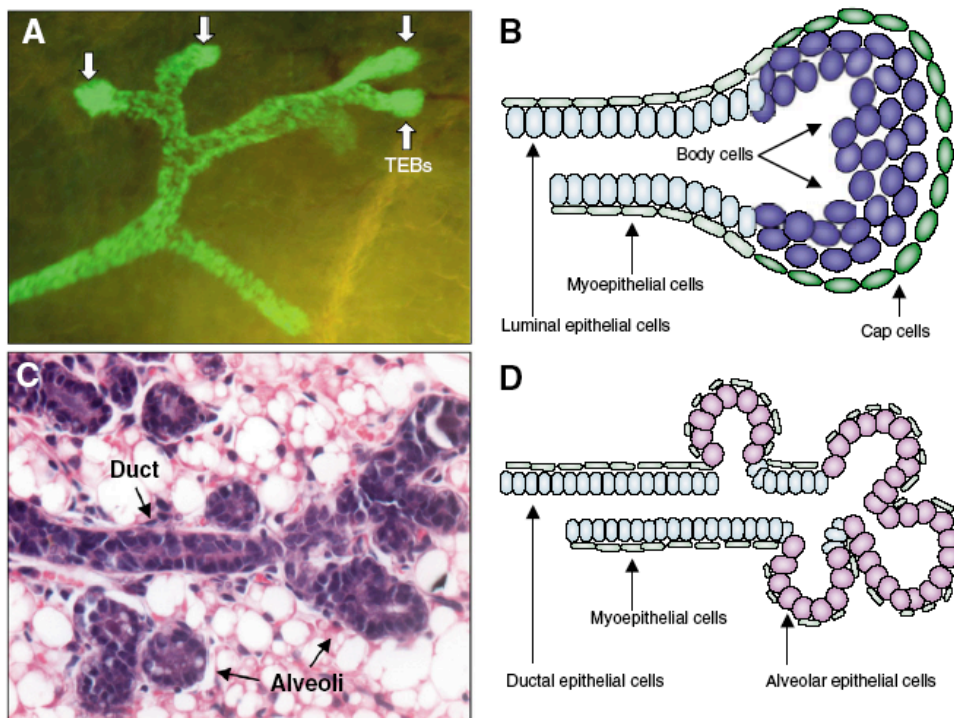


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Zellmorphologie im Ductus (C,D) und den TEBs (A,B) der Mausmamma. In den TEBs liegen die proliferativen Body- und Cap-Zellen, die möglicherweise Progenitorzellen der Mamma darstellen. Aus diesen entwickeln sich die luminalen und die myoepithelialen Zellen. Auch im Ductus und den Alveoli bilden sich zwei Zellschichten. Die duktaalen bzw. alveolaren Epithelzellen grenzen an den Hohlinnenraum, die myoepithelialen Zellen liegen der Basalmembran auf. (nach Woodward W. et al., 2005).

3. Unterschiede zwischen humaner und muriner Mamma

Viele Erkenntnisse über die Entwicklung der Brust beruhen auf Studien in Mäusen, da hier die einzelnen Entwicklungsstadien detailliert untersucht werden können. Im Gegensatz zur menschlichen Brust hat die Maus fünf Brustdrüsenpaare und keine lobuläre Anordnung innerhalb der einzelnen Brustdrüsen. Im Einzelnen bezeichnet man die terminalen Endeinheiten, an denen sich die Alveoli bilden, bei der Maus als terminale Endknospen ("terminal end buds"), wohingegen die funktionelle Einheit beim Menschen als terminale ductulo-lobuläre Einheit (TDLE) bezeichnet wird. Jede TDLE besteht aus einem Gang, Verzweigungen und Acini und bildet einen Lobus. Jeder intralobuläre terminale Ductus bzw. jeder Lobulus ist von lobulärem Stroma umgeben, das keine Adipozyten enthält. Jeder Lobus liegt hingegen in einem losen, interstitiellen Stroma, das bereits Adipozyten aufweist und mehr und mehr in Fettgewebe übergeht (Abbildung 3A, B). Betrachtet man die Interaktion von Stroma und Fettgewebe in der murinen Mamma, so fällt auf, dass hier ein enger Kontakt zwischen den Epithelzellen, Fibroblasten und den Adipozyten besteht (Abbildung 3C, D). Gerade die Interaktion zwischen Epithel und Stroma ist entscheidend in der Entwicklung der Mamma und auch in der Entstehung des Mammakarzinoms, da nicht nur Signalwege des Epithels an der Tumorigenese beteiligt sind, sondern auch stromale Signalwege.

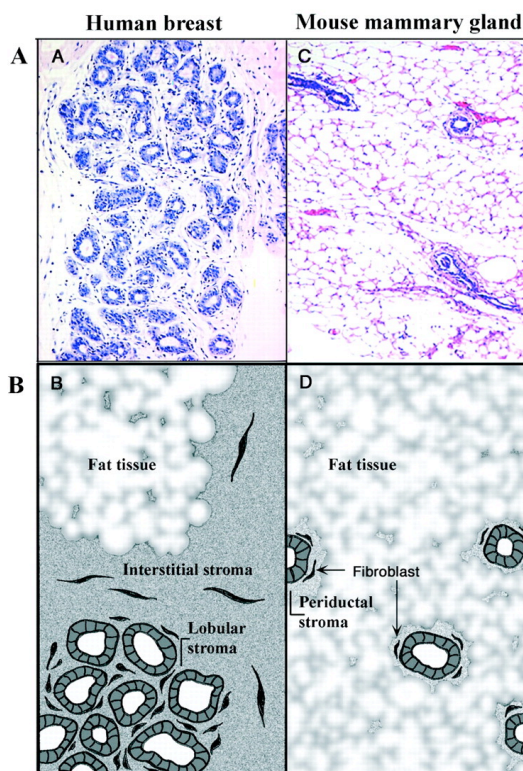


Abbildung 3. A, B Querschnitt durch humanes Brustgewebe. Brustgewebe und Fettgewebe sind deutlich voneinander getrennt. Anordnung der Alveoli in Lappen. B. Schemazeichnung zu A. **C, D Querschnitt durch murines Brustgewebe.** D. Schemazeichnung zu C. Direkter Kontakt zwischen Fettgewebe und Brustgewebe. Lose Anordnung der Alveoli. (nach Parmar H. und Cunha G.R., 2004).

4. Klassifizierung des Mammakarzinoms

Sowohl in der Maus, als auch im Menschen kann man Mammatumore in drei große Klassen einteilen: die Hyperplasien, die benignen Adenome und die malignen Karzinome [1]. Kennzeichen für die atypischen Hyperplasien ist die verstärkte intraluminale Proliferation der Epithelzellen in den TDLEs, die mikroskopisch keine Kernatypien aufzeigen. Zu den benignen Tumoren gehören die Adenome, die überwiegend aus anormal proliferierendem Drüsenepithel bestehen und sich scharf vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Sie weisen somit eine intakte Basalmembran auf und invasieren das umliegende Gewebe nicht. Als Mammakarzinom bezeichnet man jeden malignen Tumor des Brustparenchyms, wobei eine Entwicklung über ein nichtinvasives Karzinom *in situ* vorgeschlagen wird. Die Klassifizierung beruht zum Großteil auf histo-pathologischen Untersuchungen von Gewebepreparaten und deren Korrelation mit dem klinischen Verlauf.

II. Induktion von Mammatumoren in der Maus

1. Inzucht-Mausstämme mit hoher Tumorrare

Studien, die zur Aufklärung der Initiation und Progression von Brusttumoren beitragen, sind von jeher von großem Interesse. Um die frühen und die späten Schritte in der Tumorigenese untersuchen zu können, sind verschiedene Mausmodelle etabliert worden. Ein experimentelles Model für die Entstehung von Mammatumoren in der Maus verwendet den "mouse mammary tumor virus" (MMTV) als biologisches Mutagen. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts hatte man beobachtet, dass bestimmte Mausstämme (z.B. C3H, DBA und GR) mit hoher Frequenz Brusttumore entwickeln. Schnell erkannte man, dass das Auftreten von Mammakarzinomen in diesen Mäusen mit exogenen Faktoren gekoppelt ist, zu denen die vererbliche Prädisposition, hormonale Einflüsse und ein exogener Faktor gehören. Bittner entdeckte 1936, dass Stämme, die eine hohe Tumorrare aufweisen, diesen Faktor mit der Muttermilch übertragen (Bittner JJ., 1936). Nach eingehenden Untersuchungen erkannte man im Laufe der Zeit, dass es sich bei dem sog. Bittner-Faktor um ein Virus handelt.

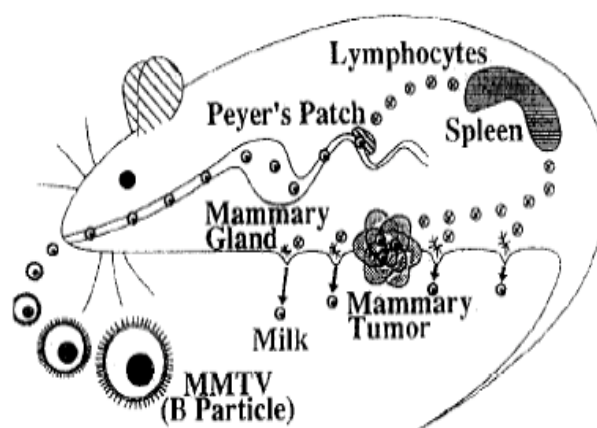
In allen Mausstämmen, die eine hohe Tumorrare zeigen, wird MMTV als exogenes Partikel über die Muttermilch auf die Folgegeneration übertragen (horizontale Übertragung). C3H- und GR-Mäuse enthalten zusätzliche MMTV-Genome (Mtv-1 und Mtv-2), die dominant exprimiert und endogen über die Keimbahn vererbt werden (vertikale Übertragung) [2] [3].

Von einer Schwangerschaft unabhängige Tumore werden in weiblichen C3H-Mäusen entwickelt, die als klonaler Auswuchs hyperplastischer alveolarer Knoten (hyperplastic alveolar nodes, HAN) in Erscheinung treten [4]. Nach Entfernung der horizontalen MMTV-Form entwickeln C3H-Mäuse noch stets schwangerschaftsunabhängige Tumore, die sich aufgrund von Infektion mit endogen kodierenden MMTV-Formen (Mtv) bilden.

Inzwischen sind mehr als 30 dieser keimbahnassoziierten Mtv-Loci bekannt, von denen in den meisten Inzucht-Mausstämmen zwei bis acht Kopien weitervererbt werden [5].

Während die durch exogene Infektion ausgelösten Tumore bereits in den ersten vier Lebensmonaten entstehen, bilden sich die Mtv-induzierten Tumore erst im zweiten Lebensjahr [6]. Kreuzungsversuche zwischen Balb/c-Mäusen, die nur in geringem Maße zu spontaner Tumorentstehung neigen, und C3H-Mäusen ergaben eine erhöhte Rate an schwangerschaftsunabhängigen Tumoren durch die Infektion mit exogenem MMTV (C3H) [7].

Abbildung 4. Lebenszyklus von MMTV. Nach Aufnahme mit der Muttermilch wandert MMTV zu den Peyerschen Plaques. Nach erfolgreicher B- und T-Zellinfektion gelangt MMTV in die Epithelzellen der Brust und wird während der Laktation wieder in die Milch sezerniert. (nach Matsuzawa A. 1995).



2. Infektionsübertragung von MMTV

MMTV gehört zur Klasse der Retroviren (Reverse Transkriptase Onkovirus), also Viren, deren Genome als einzelsträngige RNA vorliegen und durch das Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben werden. Nach erfolgreicher Transkription kann das doppelsträngige Provirus dann in die DNA des Wirtes integrieren und über die Keimbahn vererbt werden. In den meisten Mausstämmen werden diese DNA-Sequenzen jedoch nicht exprimiert [8]. Im exogenen Virus liegt das virale Genom als RNA vor. Diese Form (auch B-Partikel genannt) ist vor allem verantwortlich für die Induktion der Mammatumore in mit MMTV-induzierten Mäusen [9].

Der Lebenszyklus von MMTV (Abbildung 4) beginnt mit der viralen Ausscheidung über die Muttermilch und der Aufnahme durch säugende Jungen. Dabei gelangt MMTV über das intestinale Epithel zu den Peyerschen Plaques, in denen MMTV zunächst B-Zellen infiziert [10]. Die B-Zellen präsentieren in Folge der Infektion viruseigenes Superantigen (Sag) auf ihrer Oberfläche an T-Zellen. Die Interaktion zwischen B- und T-Zellen löst eine Aktivierung aus, die zur Vermehrung der B- und T-Zellen in der Milz führt. Untersuchungen haben gezeigt, dass B- und T-Zellen für die Infektion entscheidend sind, jedoch nur T-Zellen MMTV in die Brustdrüsen übertragen können [11, 12]. In den alveolaren Epithelzellen der Brustdrüsen, dem eigentlichen Ziel von MMTV, erfolgt die Integration der proviralen MMTV-Form und die Replikation von reifen viralen Partikeln. Weiterhin vererben weibliche Mäuse diese Mammazellen, mit den neuen Integrationen, auf die Folgegeneration weiter. Unter dem Einfluss von Steroidhormonen, die während der Stillzeit in hoher Konzentration vorliegen, wird die MMTV-Expression deutlich gesteigert und neu gebildete Viruspartikel werden mit der Muttermilch sezerniert, wodurch der MMTV-Lebenszyklus geschlossen ist.

3. Retrovirale Insertionsmutagenese

Die Entstehung von Mammatumoren in verschiedenen Mausstämmen kann durch die Induktion von exogenem MMTV ausgelöst werden. Während akut transformierende Retroviren (z.B. Src) Tumore nach einer Latenzzeit von 2 bis 3 Wochen nach Infektion hervorrufen, entstehen Tumore, die durch langsam transformierende Retroviren (z.B. MMTV) ausgelöst werden, erst nach einer Latenzzeit von 3 bis 12 Monaten.

Die Tumorigenität von MMTV beruht, im Gegensatz zu den akut transformierenden Retroviren, nicht auf dem Vorhandensein von viralen Onkogenen im viralen Genom, sondern auf einem Mechanismus, den man „retrovirale Insertionsmutagenese“ nennt. Darunter versteht man die transkriptionelle Änderung von Genen des Wirtsgenoms aufgrund der Insertion der proviralen DNA in das Wirtsgenom. Wenn sich das Virus in der Nähe von wirtseigenen Genen integriert, können diese, je nach Art der Integration aktiviert oder inhibiert werden oder verkürzte Transkripte bilden (Abbildung 6). Das provirale Genom enthält Elemente, die die virale Transkription regulieren, aber auch als Promotor auf zelluläre Gene wirken können (Abbildung 5). Diese Elemente (Promotor und Verstärker) sind in der U3-Region der beiden Long Terminal Repeats (LTRs) lokalisiert. Je nach Integrationsmodus und transkriptioneller Orientierung des Provirus können diese Elemente die Transkription verstärken oder unterbrechen und somit onkogenen Einfluss ausüben (Abbildung 6) [13]. Dementsprechend unterscheidet man die Aktivierung von Genen durch Promotorinsertion (promotor insertion) oder Verstärkermechanismus (enhancer mechanism), sowie Proteinverkürzungen durch Promotorinsertionen oder Termination der Transkription [14].

Um die Genaktivierung durch Promotorinsertion auszulösen, muss das Provirus so inserieren, dass es in der transkriptionell gleichen Orientierung wie das Zielgen liegt. Die Transkription wird dann vom proviralen Promotor gestartet, wodurch der geneigene Promotor umgangen wird [15]. Deshalb weisen mRNA-Transkripte, die durch MMTV-Promotorinsertion gebildet werden, auch einen Teil der proviralen LTR-Region auf.

Der am häufigsten beobachtete Mechanismus, der zur Genaktivierung in MMTV-induzierten Tumoren führt, ist der Verstärkermechanismus. Die Transkription eines wirtseigenen Gens wird über ein Verstärkerelement in der U3-Region der LTRs ausgelöst, das auf den geneigenen Promotor wirkt. Der Verstärkermechanismus ist in der Lage über eine Distanz von über 10 kb zu wirken [16]. Verstärkerinsertionen beinhalten die Integration des Provirus entweder am 5' Ende des betroffenen Gens in reverser Orientierung oder am 3' Ende in gleicher Orientierung [14]. Da MMTV transkriptionell entgegengesetzt orientiert ist, werden keine proviralen Sequenzen in dem Transkript des Wirtsgens angetroffen.

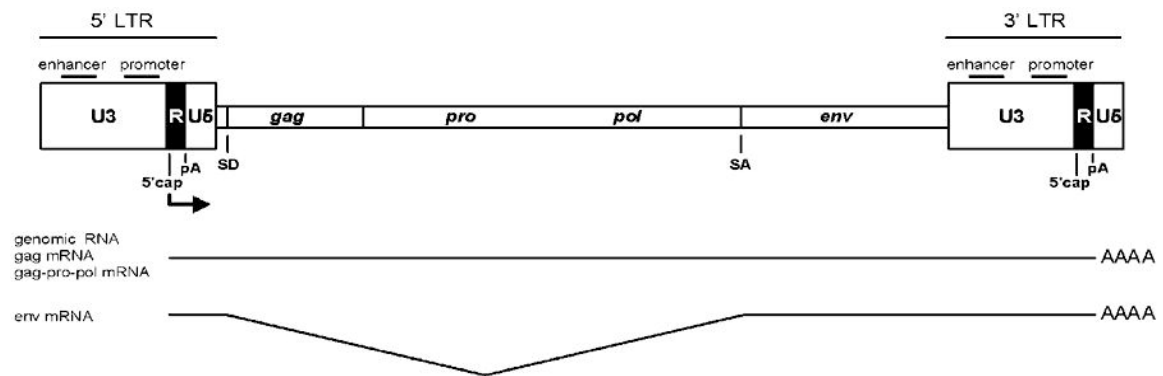


Abbildung 5. Struktur von MMTV. Die viruseigenen Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env* werden beidseitig von den LTR's flankiert (5' und 3' LTR). In der U3-Region der LTR's befinden sich die Verstärker- und Promotorelemente. (nach Uren A.G. et al., 2005).

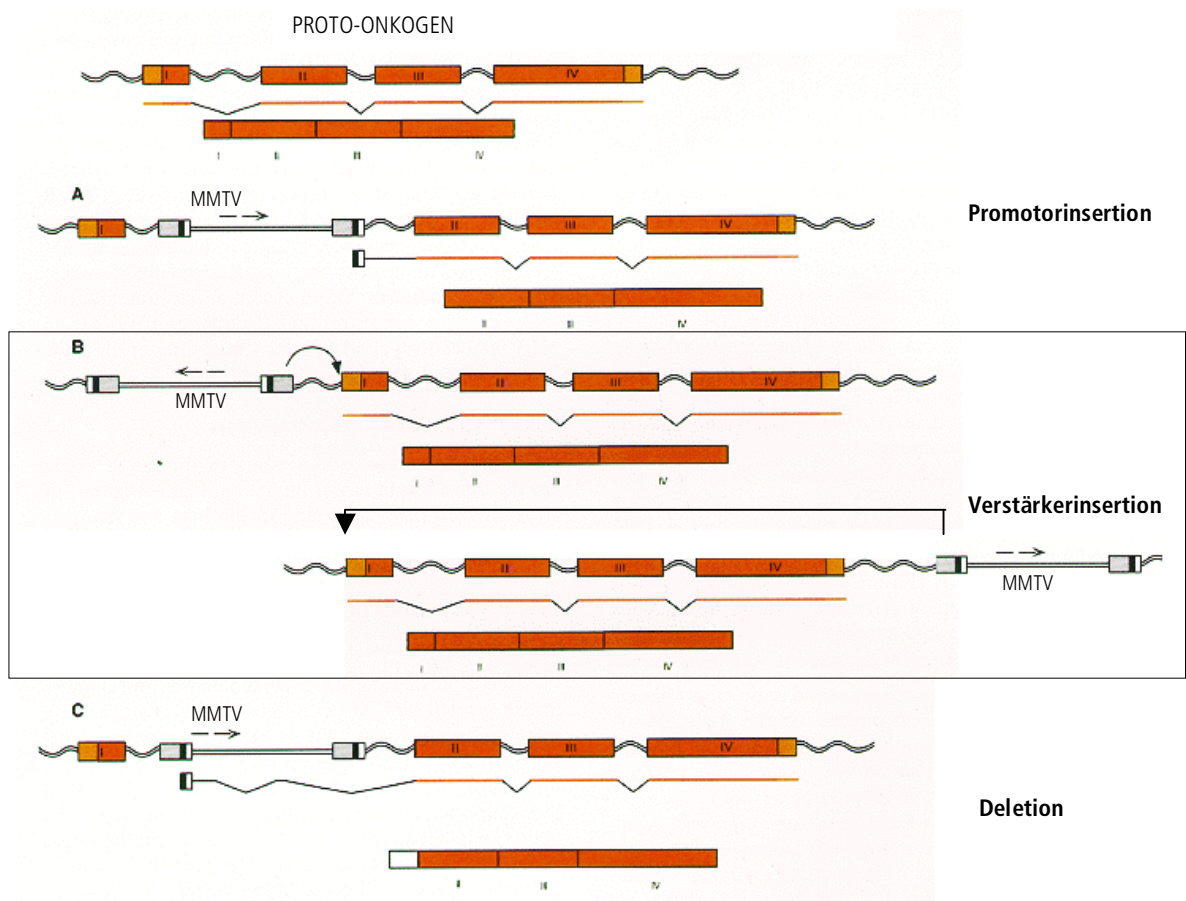


Abbildung 6. Übersicht über verschiedene Möglichkeiten, durch MMTV-Insertion die Expression von Genen zu beeinflussen. Geläufig sind der Promotor-Mechanismus (A) und der Verstärkermechanismus (B). Verkürzungen des Transkripts sind eine weitere Möglichkeit, wie MMTV auf zelluläre Gene wirken kann (C). Das MMTV-Provirus ist grau dargestellt, die Exonregionen des Zielgens in Orange. (Modifiziert nach Retroviruses, Edited by Coffin J.M., Hughes S.H. and Varmus H.E., 1997)

III. Aktivierung von Signalwegen in Mammatumoren

1. Gene und Signalwege in Mammatumoren

Die ersten Studien in den 80er Jahren, in denen retrovirale Insertionen in Tumoren untersucht wurden, zeigten, dass Gene und Signalwege gefunden werden konnten, die für die Entwicklung von Tumoren relevant sind [17-22]. Doch erst durch verbesserte Technologien (PCR, Sequenzierung) und die Bereitstellung des Mausgenom konnten die Untersuchungen in großem Umfang und mit geringerem Zeitaufwand als noch vor 20 Jahren durchgeführt werden [23-25]. Die bislang veröffentlichten Daten, die aus Hochdurchsatzanalysen gewonnen wurden, beschränken sich jedoch auf Untersuchungen in Lymphomen. Aber auch in Mammatumoren wurde bereits die retrovirale Insertionsmutagenese genutzt, um Gene zu identifizieren, die an der Tumorigenese von Mammatumoren beteiligt sind. Nusse und Varmus [23] publizierten 1982 eine Studie, in der die erste gemeinsame Integrationsstelle („common integration site“, CIS) *int1* beschrieben wurde. Als CIS werden Gene bzw. Genloci bezeichnet, die in mindestens zwei unabhängigen Tumoren durch die Integration eines Retrovirus eine veränderte Expression erfahren. Bis heute konnten insgesamt 14 CIS in MMTV-induzierten Mammatumoren identifiziert werden (Tabelle 1) [26], von denen 12 Gene ein onkogenes Potential aufweisen (*Fgf3*, *Fgf4*, *Fgf8*, *Fgf10*, *Int-5*, *Int-6*, *Map3k8*, *Notch1*, *Notch4*, *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt10b*). Für sechs der 14 CIS konnte auch eine Beteiligung in humanen Brusttumoren nachgewiesen werden (*Fgf8*, *Fgf10*, *Int-5*, *Map3k8*, *Notch1* und *Wnt10b*). Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, sind vor allem *Wnt*-, *Fgf*- und *Notch*-Gene als CIS in Maus-Mammatumoren aktiviert. Alle drei Genfamilien sind an der Entwicklung des embryonalen Brustgewebes beteiligt.

Die Familie der *Fgf*-Gene („fibroblast growth factors“) wirkt unter anderen mitogen, chemotaktisch oder als Vermittler zellulärer Differenzierung. *Fgf*-Gene sind auch für ihre angiogenetische Wirkung *in vivo* bekannt [27]. In Maus-Mammatumoren erfolgte die Aktivierung der *Fgf*-Gene durch die Integration von MMTV stromabwärts des *Fgf*-Genlokus und in transkriptionell entgegengesetzter Orientierung. Wie auch bei den als CIS gefundenen *Wnt*-Genen wurden die *Fgf*-Gene über den Verstärkermechanismus ausgehend von den LTR-Regionen des Virus aktiviert [28].

Die Familie der *Notch*-Gene kodiert für Transmembran-Rezeptoren, die innerhalb der Entwicklung das Zellschicksal festlegen [29]. Eine *Notch*-Genexpression kann bereits in den Brustdrüsen jungfräulicher, aber auch schwangerer oder stillender Mäusen gefunden werden [4]. In MMTV-induzierten Tumoren wurde ein verkürztes NOTCH4-Protein gebildet, das als Mutante einen Funktionalitätszuwachs aufweist und dadurch neoplastische Transformationen auslösen kann [30].

Tabelle 1. Onkogene und Kandidaten Onkogene, durch MMTV-induzierte Insertionsmutagenese in Maus-Mammatumoren identifiziert¹.

Gen	Gen-Produkt	Onko-gen	Beteiligung in humanen Brusttumoren	Referenz
<i>Fgf3/ Int2</i>	Fibroblast growth factor	ja	nein	[31]
<i>Fgf4</i>	Fibroblast growth factor	ja	nein	[32]
<i>Fgf8</i>	Fibroblast growth factor	ja	ja	[33]
<i>Fgf10</i>	Fibroblast growth factor	ja	ja	[34]
<i>Int-5/ Int-H</i>	Aromatase	ja	ja	[35]
<i>Int6/ Eif3e</i>	Translations Initiationsfaktor 3 Untereinheit	ja	nein	[36]
<i>Int7</i>	Thrombospondin-domäne beinhaltendes Gen	nein	nein	[37]
<i>Int-41</i>	Unbekannt	nein	nein	[38]
<i>Map3k8/ Tpl2</i>	Mitogen-aktivierende Proteinkinase	ja	ja	[39]
<i>Notch1</i>	Rezeptor/ Transkriptions-Kofaktor	ja	ja	[40]
<i>Notch4/ Int3</i>	Rezeptor/ Transkriptions-Kofaktor	ja	nein	[41]
<i>Wnt1/ Int1</i>	Morphogen	ja	nein	[23]
<i>Wnt3</i>	Morphogen	ja	nein	[42]
<i>Wnt10b</i>	Morphogen	ja	ja	[43]

¹ modifiziert nach Hilkens J. (2006)

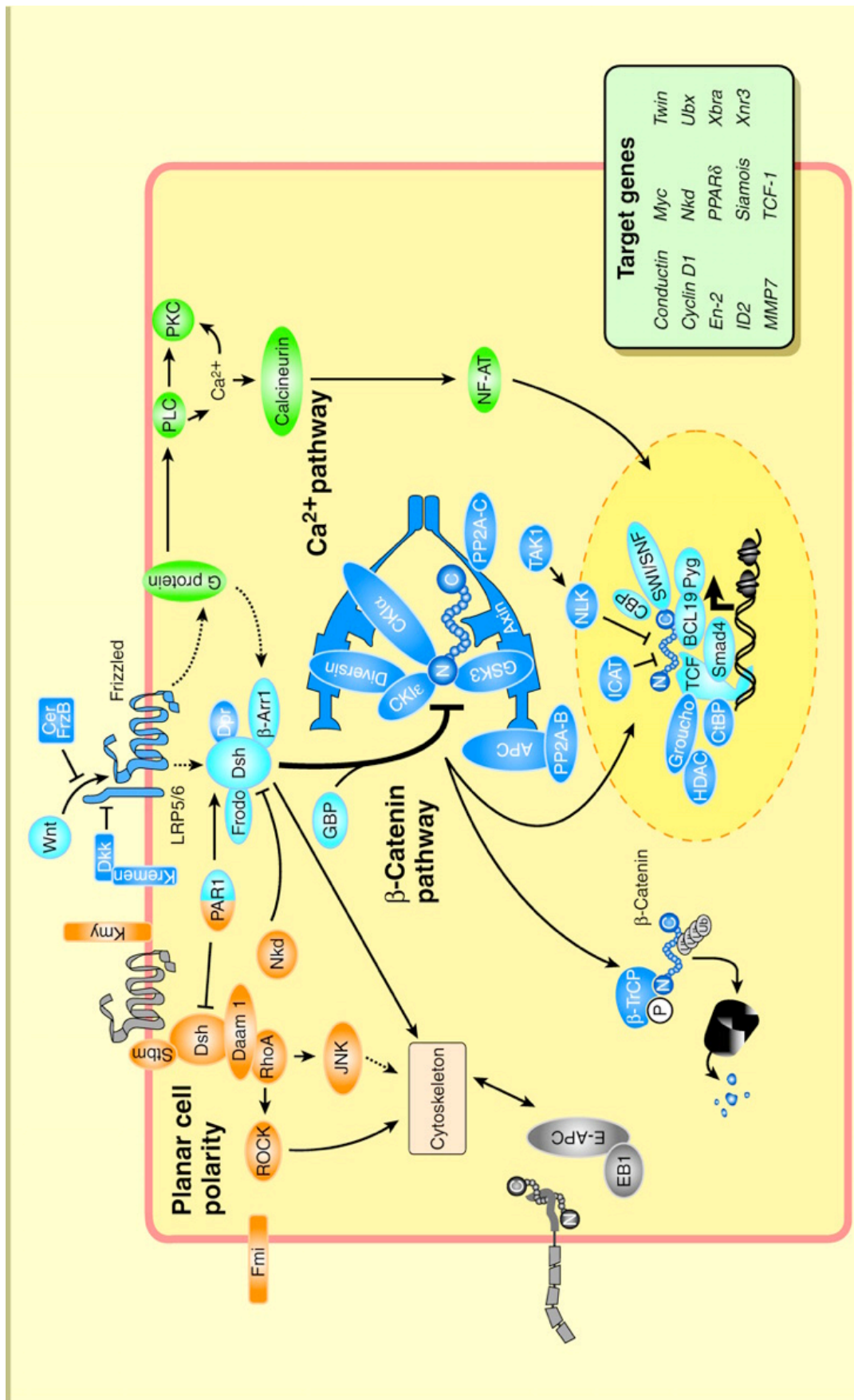


Abbildung 7. Die Wnt-Signalwege. Bislang wurde die Aktivierung von drei verschiedenen Signalwegen durch *Wnt*-Gene beschrieben. Der am besten untersuchte ist der Wnt/Beta-Catenin-Signalweg (Bild mitte), der über Frizzled und LRP Rezeptoren aktiviert wird und die Stabilisierung von Beta-Catenin zur Folge hat. Wnt-Zielgene sind z.B. *CyclinD1* und *Myc* (Kasten rechts). Es gibt erst wenige Details aus dem Wnt/ Ca^{2+} - und dem Wnt/PCP-Signalweg, aber eine Beteiligung an der Neuordnung des Zytoskeletts über die JNK konnten nachgewiesen werden. Die Spezifität der Aktivierung ist abhängig von verschiedenen WNT-Proteinen und Rezeptoren (nach Huelsken J. und Behrens J. 2002).

2. *Wnt*-Gene und -Signalwege

1982 wurde als erste CIS in MMTV-induzierten Mammatumoren ein Gen gefunden, das als *int1* bezeichnet wurde [23]. Später erkannte man, dass dieses Gen eine sehr hohe Homologie zu dem *Drosophila* Gen *wingless* aufzeigte und benannte *int-1* in *Wnt1* um [44]. In allen analysierten Mammatumoren wurde *Wnt1* über den Verstärkermechanismus von MMTV aus aktiviert und in den Brustgeweben fehlreguliert, da *Wnt1* normalerweise nicht in den adulten Brustdrüsen exprimiert vorliegt [28].

Die Familie der *Wnt*-Gene besteht aus 19 Mitgliedern, die für sekretorische Wachstumsfaktoren kodieren. Die Mehrheit der *Wnt*-Gene ist in vier Exonbereiche unterteilt und weist eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf (bis zu 83%). WNT-Proteine sind in einem Großteil der Gewebe anzutreffen und kontrollieren Prozesse wie Zellwachstum, Zelltod und Differenzierung [45]. *Wnt*-Gene sind wichtig für das Überleben einer normalen wie auch entarteten Zelle und maßgeblich an der Onkogenese von Mammatumoren beteiligt [46]. Doch nicht nur *Wnt*-Gene, sondern auch Gene, die stromabwärts im Signalweg liegen, sind immer wieder mit Krebs in Verbindung gebracht worden [47]. Bislang sind drei unterschiedliche Signalwege beschrieben worden, an denen *Wnt*-Gene beteiligt sind [48-57]:

- a) Wnt/ Beta-Catenin-Signalweg
- b) Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg
- c) Wnt/ Zellpolariät-Signalweg

Der Wnt/ Beta-Catenin-Signalweg (Abbildung 7, Mitte) kann durch die meisten *Wnt*-Gene aktiviert werden (z.B. *Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt3a* und *Wnt8*) und resultiert in der Translokation von BETA-CATENIN in den Nukleus und der Aktivierung spezifischer Gene. Der Wnt/Beta-Catenin-Signalweg wird durch die Bindung des WNT-Proteins an seine Rezeptoren Frizzled (FZ) und LRP5/6 induziert. Die Bindung an die Rezeptoren kann durch verschiedene Faktoren inhibiert werden, wie z.B. Cerberus (cer) und FRZB, die beide an WNT binden und dadurch die Bindung von WNT an den Rezeptor blockieren, oder durch Dickkopf (DKK), das den LRP-Rezeptor blockiert. Intrazellulär wird durch die Bindung WNT-FZ-LRP eine Stabilisierung von zytoplasmatischem BETA-CATENIN erreicht. In Abwesenheit von WNT wird BETA-CATENIN durch die Casein Kinasen CK1 α und CK1 ϵ phosphoryliert. Dies führt zur Phosphorylierung von BETA-CATENIN durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β), was wiederum die Ubiquitinierung von Beta-Catenin durch β TrCP auslöst. Vollständig phosphoryliertes und ubiquitiniertes Beta-Catenin wird schließlich in den Proteasomen degradiert. Die Phosphorylierung von BETA-CATENIN erfolgt in einem Mult-Proteinkomplex bestehend aus dem Gerüstprotein Axin, dem Tumorsuppressor-Protein APC, GSK3 β und Diversin, das CK1 ϵ an den Komplex bindet. Die Degradierung von phosphoryliertem BETA-CATENIN wird weiterhin durch die Serin/Threonin-Phosphatase PP2A reguliert. In der Anwesenheit von WNT blockiert Dishevelled (DSH) die Degradierung von BETA-CATENIN über einen noch unbekannten Mechanismus. Die PAR1-Kinase reguliert DSH, wodurch der Wnt-Signalweg ermöglicht, der JNK-Signalweg hingegen blockiert wird.

Durch die Aktivierung des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs unterbleibt die Phosphorylierung von BETA-CATENIN und stabilisiertes BETA-CATENIN gelangt schließlich in den Nukleus. Dort bindet Beta-Catenin an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren und leitet die Transkription von Wnt-Zielgenen ein. Zusätzlich wird die Transkription auch durch Interaktion von BETA-CATENIN mit der Histon-Acetyltransferase CBP, dem SWI/SNF-Komplex und an Pygopus gebundenes Bcl19 reguliert. Zu den Zielgenen gehören unter anderem *Conductin*, *c-myc*, *Cyclin-D1*, *En-2*, *MMP7*, *Nkd*, *Siamois* und *Ubx*, Gene, die bereits mit Tumoren in Verbindung gebracht wurden.

Der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg (Abbildung 7, rechts) reguliert die Zellmigration und spielt eine wichtige Rolle während der Bildung der dorsoventralen Achse und der Herzentwicklung und ist wahrscheinlich auch an der Tumorsuppression beteiligt. Bislang wurden *Wnt4*, *Wnt5a* und *Wnt11* mit diesem Signalweg in Zusammenhang gebracht. Im Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg kommt es zur Ausschüttung von intrazellulärem Kalzium und Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Komponenten, wie die Calmodulin-abhängige Kinase (CaM-Kinase II). Dieser Signalweg wird wahrscheinlich über G-Proteine vermittelt und kann dem Wnt/Beta-Catenin-Signalweg entgegen wirken. Beteiligte Komponenten sind die Phospholipase C (PLC) und die Proteinkinase C (PKC) sowie die Phosphatase Calcineurin, die zur Dephosphorylierung und Akkumulierung des Transkriptionsfaktors NF-AT führt.

Der Wnt/Zellpolarität-Signalweg (Abbildung 7, links) verläuft über den Frizzled Rezeptor und die JunN-terminale Kinase (JNK), leitet die asymmetrische Organisation des Zytoskelettes und koordiniert die Polarisation der Zellen innerhalb eines epithelialen Verbandes. Bislang wurden *Wnt5a* und *Wnt11* als Initiatoren für den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg beschrieben [58].

4. Wnt-Signalwege in der Brustentwicklung und in Mammatumoren

Der Wnt/Beta-Catenin-Signalweg ist ein wichtiger Signalweg in der Embryonalentwicklung, und auch in der Onkogenese solider Tumore findet man immer wieder Komponenten aus diesem Signalweg. Die Induktion des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs löst die Entwicklung der Brustplakoden aus und ist essentiell für das Auswachsen der Brustknospen [47]. Diese Rolle des Signalwegs wurde auch für die Induktion von Haarfollikeln beobachtet [59].

Eine *Wnt3*-, *Wnt3a*-, *Wnt6*- und *Wnt10b*-Expression wurde entlang der Milchleiste gefunden, *Wnt5a* und *Wnt11* fördern den Auswuchs hingegen nicht [60]. Interessanterweise scheint FGF10 für das Ansprechen epithelialer und mesenchymaler Zellen in der Region der Brustplakoden auf WNT verantwortlich zu sein. Die Interaktion zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen ist während der gesamten Brustentwicklung von Bedeutung [61] und kann von WNT-Proteinen vermittelt werden [62], [63]. Auch die Homeobox-Gene *Msx1* und *Msx2*, zwei Zielgene im Wnt/Beta-Catenin-Signalweg, sind in den Brustknospen exprimiert [64]. Während der postnatalen Entwicklung wurde beobachtet, dass *Wnt1* das duktales Wachstum in den TEBs fördert. *Wnt4* ist an der lobularen Entwicklung während der Schwangerschaft beteiligt und wird über Sexualhormone reguliert [65].

Die onkogene Wirkung von *Wnt*-Genen konnte in transgenen Mausmodellen gezeigt werden. *Wnt1* löst unter der Kontrolle des MMTV-Promotors eine lobuloalveolare Hyperplasie und eine duktale Hyperverzweigung in den Brustgeweben von Mäusen aus [66]. Den gleichen Phänotyp konnte man in MMTV-*Wnt10b* transgenen Mäusen beobachten, was dafür spricht, dass *Wnt*-Gene an der Induktion von Mammatumoren in verschiedenen Inzuchtstämmen beteiligt sind [67]. Weiterhin hat man beobachtet, dass *Wnt1* mit *Fgf*-Genen kooperiert (*Fgf3*, *Fgf4* und *Fgf8*) und dadurch die Tumorentwicklung beschleunigt [33, 68, 69].

Auch in humanen Brusttumoren konnte eine Beteiligung des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs nachgewiesen werden. Unter anderen wurden *Wnt1*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt7a* und *Wnt10b* in Brustkrebs-Zelllinien und Brusttumoren exprimiert [70-74]. Das Axin-Homolog *Axin2/Conductin* liegt in einer chromosomalen Region, die in Brusttumoren häufig deletiert ist [75] und auch in Kolonkarzinomen oder Medulloblastomas [76] häufig angetroffen wird. Eine Mutation des Tumorsuppressor-Gens *APC* wurde als der auslösende Mechanismus identifiziert, der Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) zugrunde liegt [77]. Mutationen im *Beta-Catenin*-Gen sind z.B. in Melanomen, Hepatokarzinomen und Kolonkarzinomen gefunden worden und obwohl nukleäres BETA-CATENIN auch in Brusttumoren identifiziert werden konnte [78], wurden keine Mutationen in dem Gen nachgewiesen [79]. Weiterhin wurde der Verlust von E-Cadherin als häufiges Ereignis in humanen Brusttumoren beschrieben [80]. Das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von Epithelien. Wiederum spielt Beta-Catenin eine besondere Rolle, da es neben seiner Funktion im Wnt-Signalweg als zytoplasmatisches Ankerprotein E-Cadherin mit dem Zytoskelett der Zelle verbindet [81].

Die Deregulierung der Wnt-Signalwirkung könnte die Tumorbildung, die Invasion oder die Metastasierung durch eine Störung der Spindelformation fördern, oder Stammzellen im Zyklus der Selbsterhaltung forcieren und somit die Chance erhöhen, dass sich weitere Mutationen manifestieren. Die Identifizierung von *Cyclin-D1* und *c-myc* als Zielgene des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs machte deutlich, dass es eine Verbindung zwischen falsch regulierter Wnt-Signalwirkung und aberranter Zellproliferation geben könnte. So weisen die Hälfte aller Brusttumore eine *Cyclin-D1*-Überexpression auf, aber nur in 15-20% der Tumore geht diese mit einer Genamplifikation einher [82]. Obwohl in humanen Brusttumoren noch nicht bewiesen ist, dass der Wnt/Beta-Catenin-Signalweg eine Ursache für die Tumorentstehung ist, sprechen doch zahlreiche Untersuchungen für eine Beteiligung. Die Identifizierung zusätzlicher Zielgene in den verschiedenen Wnt-Signalwegen sowie deren Regulierung wird das Verständnis für die Entstehung von Brusttumoren erleichtern.

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Genen, die an der Tumorigenese von Mammatumoren beteiligt sind. Dabei waren nicht nur Gene von Interesse, die zur Induktion von Mammatumoren beitragen, sondern vor allem die Gene, die an der Progression und der Invasion beteiligt sind.

Um die gesamte Tumorentwicklung genetisch analysieren zu können, sollte ein neues Mausmodell etabliert werden, die sogenannte BALB/c⁺-Maus. Da das Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) Mammatumore auslöst, kann man sich MMTV zu Nutze machen um das Mammatumorstadium in BALB/c-Mäusen zu erhöhen. Für die Infektion kann man eine Methode verwenden, die man im Allgemeinen als „forster nursing“ bezeichnet. Die Infektion erfolgt dabei über die Muttermilch von Zuchtmäusen, die aktives MMTV sezernieren. Auf diese Weise infizierte BALB/c-Mäuse sollten als BALB/c⁺-Mäuse bezeichnet werden. Die in BALB/c⁺-Mäusen entstehenden Mammatumore können anschließend entnommen und analysiert werden. Nach der Isolierung von genomischer DNA sollte als erstes die Splinkerette-PCR zur Identifizierung der Integrationsstellen etabliert werden. Mit dieser Methode lassen sich Integrationsstellen amplifizieren und ihre Lage im Mausgenom durch anschließende Sequenzierung bestimmen. Flankierende Gene stellen potentielle Onkogene dar, da sie durch die Aktivierung von MMTV an der Tumorbildung beitragen könnten. Die induzierte Expression dieser Gene sollte deshalb mittels RT-PCR geprüft werden, um zu bestätigen, dass es sich hierbei tatsächlich um MMTV-Zielgene handelt.

Zu einem späteren Zeitpunkt sollten *in vitro* und *in vivo* Analysen der MMTV-Zielgene durchgeführt werden, um ihr onkogenes Potential zu überprüfen. Dabei hat sich die Transduktion von epithelialen Mammazellen als geeignetes Testsystem erwiesen, um die Fähigkeit zur Transformation *in vitro* sowie das Tumorstadium in Mäusen nach s.c. Injektion *in vivo* zu untersuchen.

Weiterhin war geplant, die tierexperimentellen Daten auf ihre klinische Relevanz zu überprüfen und zu kontrollieren, ob die potentiellen Maus-Onkogene in humanen Brusttumoren exprimiert werden.

Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurde nach Standardmethoden verfahren (Sambrook et al., 2000). Die Anleitung zur Herstellung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien ist dort beschrieben. Falls nicht anderweitig erwähnt, erfolgten die Reaktionen in den vom Hersteller gelieferten Puffern.

I. Material

1. Feinchemikalien

Feinchemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Missouri, USA), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Gibco (Eggenstein) und Promega (Madison, USA) in der jeweils höchsten Reinheitsstufe bezogen.

2. Enzyme

Alkalische Phosphatase (Shrimp):	Roche, Mannheim
Prime-It II Random Primer Labelling Kit:	Stratagene, San Diego, USA
Restriktionsenzyme:	Roche, Mannheim
RNase A:	Gibco, Eggenstein
SuperScript™ III:	Invitrogen, Carlsbad, USA
T4 Polynukleotid-Kinase:	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase:	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polymerase:	Roche, Mannheim

3. Puffer

Bei käuflich erworbenen Enzymen wurden, wenn nicht anders angegeben, die mitgelieferten Puffer des Herstellers verwendet. Standardpuffer (SSC, TAE, TBE, TE, PBS u.Ä.) wurden nach Angaben von Sambrook et al. (2000) angesetzt.

Hybmix (Southern Blot)	10% Dextransulfat
	1x SSC
	5x Denhardts Salz
	0,5% SDS

Neutralisierungspuffer (Southern Blot)	1 M Tris/HCl pH 7.4 1,5 M NaCl
Denaturierungspuffer (Southern Blot)	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
MOPS, 10x	200 mM MOPS (Morpholineopropanesulfonic Acid) 20 mM EDTA pH 8.0 50 mM NaAcetat mit NaOH auf pH 7.0 einstellen
PAA-Ladepuffer	98% Formamid 10 mM EDTA pH 8.0 Xylencyanol Bromphenolblau
PCR-Puffer, 5x	50 mM Tris/HCl pH 8.4 250 mM KCl 0,05% Gelatine 7,5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs

4. Nukleotide

Alle dNTPs wurden von Pharmacia (Freiburg) in „ultrapure“ Qualität bezogen.

5. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software Primer3 erstellt (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

MMTV-LTR-Fw:	5'- GCTGGGGCATTGGGGGAAGT -3'
MMTV-LTR-Rv:	5'- AGGGGGCATCTGTTGGTCTG -3'
4-HMSpA:	5'-CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGA GAGACCGTGGCTGAATGAGACTGGTGTGACATCGATGG -3'
4-HMSpBD:	5'- GATCCCATCGATGTCGACACCAGTCTCTAA TTTTTTTTTCAAAAAA -3'
4-HMSp-1A:	5'- AGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGAC -3'

LTR-beg-2:	5'- GTCTTTGTCTGATGGGCTCATCCG -3'
LTR-beg-4:	5'- CCTAGGTGTAGGACACTCTCG -3'
LTR-3f :	5'- GGAGTTCAACCATTCTGCTG -3'
RT-Wnt1-Fw:	5'- CCACCTCTTCGGCAAGATCGTCAA -3'
RT-Wnt1-Rv:	5'- GTGGCATTGCACTCTTGGCGCAT -3'
RT-Wnt2-Fw:	5'- CTCTGGCTCCCTCTGCTCC -3'
RT-Wnt2-Rv:	5'- CCTTGGCACTTCCTTTCTTC -3'
RT-Wnt3-Fw:	5'- GCCCAGCGTAGCAGAAGGTGTGAAG -3'
RT-Wnt3-Rv:	5'- TGTGCACATCGTAGATGCGAATACACTC -3'
RT-Wnt3a-Fw:	5' - GTGGGGCGGCTGTAGTGAG -3'
RT-Wnt3a-Rv:	5' - TCCCTCCGTCGCTCAGTG -3'
RT-Wnt10b-Fw:	5'- CGCTGCCACTGTCGTTTC -3'
RT-Wnt10b-Rv:	5'- ATGCCTGCTATTATCCTTCG -3'
hu-Wnt3a-Fw:	5'- CAGGAACTACGTGGAGATCATG- 3'
hu-Wnt3a-Rv:	5' - CCATCCCACCAAACCTCGATGTC -3'
β-actin-Fw:	5'- GGGACCTGACTGACTACCTCAT -3'
β-actin-Rv:	5'- ATAGTCCGCCTAGAAGCATTG -3'
Northern-Wnt3a-Fw:	5'- ACGGGAGCAGGGTTCATTC-3'
Northern-Wnt3a-Rv:	5'- AAACCCGTATCCCAGACAG -3'

6. Radionukleotide

[γ ³²P]-ATP (3000 Ci/mmol)

[α ³²P]-dATP (3000 Ci/mmol)

Alle Radiochemikalien wurden von Amersham (Little Chalfont, UK) bezogen.

7. Vektoren

pGEM3Zf (Promega, Madison, USA)

pCR II (Invitrogen, Grand Island, USA)

pBABE (R. Weinberg, Whitehead Institute, Boston, USA)

8. Medien

Die Herstellung von LB- und SOC-Medien erfolgte nach den Angaben von Sambrook et al. (2000).

9. Seren und Medien für die Zellkultur

Trypsin-EDTA, F12 (Ham's F12 Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium), FCS (Fetal Calf Serum); Sigma-Chemie (Deisenhofen).

10. Bakterienstämme

DH5 α : deo R, end A1, gyr A96, hsd R17(rk-, mk+), rec A1, rel A1, sup E44, thi-1, (lac ZYA-arg F)U169, ϕ 80lacZDM15, F-, l-

II. Methoden

1. BALB/c⁺-Mausmodell

Neugeborene BALB/c/He/A-Mäuse wurden mit MMTV-C3H infiziert. Die Infektion erfolgte durch das Säugen der Neugeborenen an C3H/A-Weibchen, die den Virus ihrerseits durch die Muttermilch sezernieren. Die infizierten BALB/c-Mäuse entwickeln mit einer hohen Rate Mammatumore (> 95% vor dem ersten Lebensjahr). Die Primärtumore wurden entnommen, der Großteil davon bei -80°C für genetische Analysen eingefroren und der andere Teil für histologische Untersuchungen in Formalin fixiert. Für die Untersuchung möglicher Lungenmetastasen wurden die Lungen eines Primärtumor tragenden Tieres entnommen, zerkleinert, mit dem gleichen Volumen einer extrazellulären Matrix (Matrigel) versetzt und jeweils die Hälfte subkutan (s.c.) in die linke Flanke von zwei BALB/c⁺-Mäusen (6-12 Wochen alt) injiziert. Falls sich subkutane Tumore innerhalb von sechs Monaten entwickelten, wurde mit diesen genauso verfahren wie mit den Primärtumoren. Der Primärtumor und der zugehörige subkutane Tumor wurden als genetisch identisch betrachtet und somit als ein Tumorsset gekennzeichnet und bearbeitet.

2. Humanes Gewebe

Die mRNA von 5 normalen Mammoplastien aus Brustreduzierungen und 60 ÖR-positive und -negative primäre Brusttumore wurden für die semi-quantitative und quantitative realtime RT-PCR verwendet. Die Tumore waren zufällig aus einer Anzahl von Brusttumoren ausgewählt worden, die ein hohes Karzinom/Stroma-Verhältnis aufwiesen (>50%). Das Verhältnis wurde anhand histologischer Schnitte bestimmt. Die mRNA der Tumornummern #51-#55 stammt von normalem Gewebe, die mRNA der Tumornummern #8-#15 von metastasierenden Tumoren und die mRNA der restlichen Tumore von primären Brusttumoren (< 5 cm) lymphknotennegativer Patientinnen (Alter > 55 Jahre).

3. Zelllinien

Die murine Zelllinie HC11 stammt von COMMA-D-Zellen ab, einer spontan immortalisierten BALB/c-Mamma-Zelllinie [83]. HC11-Zellen wurden in einem 1:1 Verhältnis aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und Ham's F12 Medium (DM/F12), das mit 10% FCS, 20 ng/ml EGF und 10 µg/ml Insulin angereichert wurde, kultiviert. Die humanen Brustkrebs-Zelllinien MBA-MD-231, T47D, HB100, SkBr3, MCF-7, BT549, ZR75.1 und CAMA1 sowie die normalen humanen Brustzelllinien HB100 und MCF-10A wurden in DMEM, das mit 10% FBS und 10 µg/ml Insulin angereichert wurde, kultiviert. Alle humanen Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection bezogen.

4. DNA-Isolierung

Ein Drittel des bei -80°C gelagerten Tumormaterials wurde für die Isolierung von DNA verwendet. Die DNA wurde mit dem Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Zerkleinerung erfolgte mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators (Polytron). Nach einer dreimaligen Reinigung mit Chloroform wurde die DNA mit 100%igem Ethanol gefällt und in 800 µl TE gelöst. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4°C. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte an einem UV-Spektralphotometer bei 260 nm (OD_{260nm}). Die DNA-Isolierung von normalen Geweben erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

5. RNA-Isolierung

Ein Drittel des bei -80°C gelagerten Tumormaterials wurde für die Isolierung von RNA_{total} verwendet. Tumor-RNA_{total} wurde mit TRIzol (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA_{total} wurde in Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen, in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte in einem UV-Spektralphotometer bei 260 nm (OD_{260nm}). Die Isolierung von RNA_{total} aus normalen Geweben wurde nach dem gleichen Protokoll durchgeführt.

6. Southern Blot

10 µg genomische DNA wurde mit 15 U *EcoR* I und 1x BSA in einem Volumen von 50 µl über Nacht vollständig verdaut und am nächsten Tag auf einem 0,8%igem Agarosegel in 1x TAE aufgetrennt. Das Gel wurde in 0,2 M HCl 20 Minuten depuriniert, zwei Stunden in Denaturierungspuffer geschwenkt und anschließend nach dem Standardprotokoll nach Southern auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) übertragen. Im Anschluss wurde die Membran 20 Minuten in Neutralisierungspuffer inkubiert, getrocknet und die DNA durch UV-Strahlung (302 nm, 1 min) auf die Membran gebunden (Stratalinker, Stratagene). Die Sonden wurden intern mit P^{32} α-dATP (Amersham) innerhalb einer PCR markiert (MMTV-LTR-Fw und MMTV-LTR-Rv, T_m = 58°C, 30 Zyklen).

PCR-Schema (100µl):	10 µl 10x PCR Puffer (Roche)
	6 µl 50 mM MgCl ₂
	1 µl MMTV LTR-Rv (50 µM)
	1 µl MMTV LTR-Fw (50 µM)
	1 µl 12,5 mM dCGTs
	1 µl 0,5 mM dATP
	1 µl MMTV-LTR-DNA (50 ng)
	0,5 µl Taq Polymerase (0,25 U)

Nach Reinigung über eine Sephadex-G50-Säule (1500 rpm, 1 min) und Denaturierung (98°C, 5 min) wurde die Sonde dem Hybridisierungsmix zugegeben (vorgewärmt auf 65°C) und die Membran darin bei 65°C über Nacht in einem Hybridisierungssofen (Biometra OV5) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran jeweils für 30 Minuten mit 2x SSC/0,1% SDS, 1x SSC/0,1% SDS, 0,5x SSC/0,1% SDS und 0,1x SSC/0,1% SDS bei 65°C und einmal mit 0,1x SSC bei RT gewaschen. Markierte Banden wurde auf einem Kodak X-Omat Film sichtbar gemacht.

7. Northern Blot

RNA_{total} wurde auf einem denaturierenden Agarosegel (1%) mit 1% MOPS und 1% Formaldehyd aufgetrennt. Vor dem Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) wurde das Gel für 20 Minuten in 50 mM NaOH und 20 Minuten in 20x SSC geschwenkt. Der Transfer erfolgte ebenfalls in 20x SSC und wurde in einem Vakuum-Blotter (Biorad, München) durchgeführt. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA durch UV-Belichtung (302 nm, 1 min) an die Membran gebunden. Als Hybridisierungspuffer wurde der Rapid Hybridisation Buffer der Firma Amersham (Braunschweig) verwendet.

Die Sondenherstellung erfolgte über PCR Amplifikation unter Verwendung von ³²P-dATP.

PCR-Schema (100µl):	10 µl 10x PCR-Puffer (Roche)
	2 µl 50 mM MgCl ₂
	2 µl Northern-Wnt3a-Fw (20 µM)
	2 µl Northern-Wnt3a-Rv (20 µM)
	25 ng <i>Wnt3a</i> -cDNA
	1 µl dCGTs (12,5 mM)
	4 µl dATP (0,5 mM)
	5 µl ³² P-dATP
	1,5 µl Taq-Polymerase (15 U)

Die Reinigung der Probe erfolgte über eine Sephadex G50-Säule (1500 rpm, 1 min). Nach Denaturierung der Sonde (98°C, 5 min) wurde sie dem vorgewärmten Hybridisierungspuffer (42°C) beigefügt und zusammen mit dem Filter bei 42°C über Nacht inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde der Filter 2x 30 Minuten mit 2x SSC/0,1% SDS bei 42°C und 1x 15 Minuten mit 0.5x SSC/0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Markierte Banden wurden auf Phosphorimager-Bildplatten (Fuji, Japan) unter Verwendung der zugehörigen Software (PCBAS, Raytest, Deutschland) sichtbar gemacht.

8. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg RNA_{total} eingesetzt und sdunter Verwendung des SuperscriptTM III Kit (Invitrogen) und Oligo-dT-Oligonukleotiden gemäß den Angaben des Herstellers produziert.

9. Splinkerette-PCR

Sequenzen, die 5' an MMTV angrenzen, wurden mit einem modifizierten Splinkerette-PCR-Protokoll identifiziert. Dazu wurden 2 µg Tumor-DNA mit 5 U *Xho* II (Roche) in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37°C vollständig verdaut. 300 ng der verdauten DNA wurden an die Splinkerette-Adaptoren im Verhältnis 1:15 unter Verwendung von 2 U T4 DNA-Ligase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 30 µl bei 14°C über Nacht ligiert. Die Splinkerette-Adaptoren wurden generiert, indem man je 150 pmol der Oligonukleotide HMSpA und HMSpBD in 150 µl TE aufkochte. Beim Abkühlen entstand der doppelsträngige Adaptor (Abbildung 8). Nach der Ligation des 5'-Endes der Tumor-DNA an das 3'-Ende des Adaptors erfolgte ein zweistündiger Verdau mit 20 U *Dra*I (Roche) in einem Gesamtvolumen von 40 µl. Dieser Verdau verhindert die Amplifikation von internen MMTV-Sequenzen. Nachdem die DNA mit Hilfe von Microcon YM-30 Säulen (Amicon BioSeperations) entsalzt wurde, verwendete man 50-80 ng der ligierten DNA für die Amplifikation. Hierzu wurden je 10 pmol der Oligonukleotide LTR-beg-2 (Bindung an die U3-Region der LTRs) und 4HMSp-1a (Bindung an den Adaptor) verwendet (Abbildung 8). Die Amplifikation erfolgte in 20 µl Gesamtvolumen unter Verwendung eines 5x PCR-Puffers und 2 U Taq-DNA-Polymerase (Roche) bei einer Annealing-Temperatur von 68°C (35 Zyklen). Für die Reamplifikation wurden 2 µl des primären PCR-Produkts und je 10 pmol der Oligonukleotide 4HMSp-1a und LTR-beg-4 (Bindung an die U3-Region der LTRs) verwendet. Das Oligonukleotid LTR-beg-4 wurde mit 100 pmol ³²P-γ-ATP und 20 U T4-Polynukleotid-Kinase in 20 µl Gesamtvolumen markiert. Für die Reamplifikation wurde das folgende Programm benutzt: 11 Zyklen bei T_m = 68°C, 11 Zyklen bei T_m = 67°C und 13 Zyklen bei T_m = 66°C. Zum PCR-Produkt wurden 10 µl PAA-Ladepuffer gegeben, das Gemisch denaturiert und schließlich auf einem denaturierenden 3,6% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf 3 mm Papier (Whatman) getrocknet und die Banden auf einem X-Omat AR Film (Kodak) sichtbar gemacht. Die Banden wurden ausgeschnitten und die DNA in 50 µl Wasser bei RT über Nacht eluiert. 5 µl des gelösten PCR-Produkts wurden erneut mit den Oligonukleotiden LTR-beg-4 und 4HMSp-1a wie bereits beschrieben reamplifiziert (T_m = 66°C, 30 Zyklen). Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einem UV-Leuchttisch ausgeschnitten und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gereinigt. Für die darauf folgende Sequenzierung wurden das Oligonukleotid LTR-3f (7,5 pmol) und 4 µl BigDye Terminator Mix (ABI) benutzt.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Sequence Navigator (Applied Biosystems, USA) analysiert. Mit den Sequenzen, die eine 5' MMTV-LTR Sequenz aufwiesen, wurden eine Sequenzanalyse gegen die Ensembl Mausgenom Datenbank (<http://www.Ensembl.org/index.html>) durchgeführt.

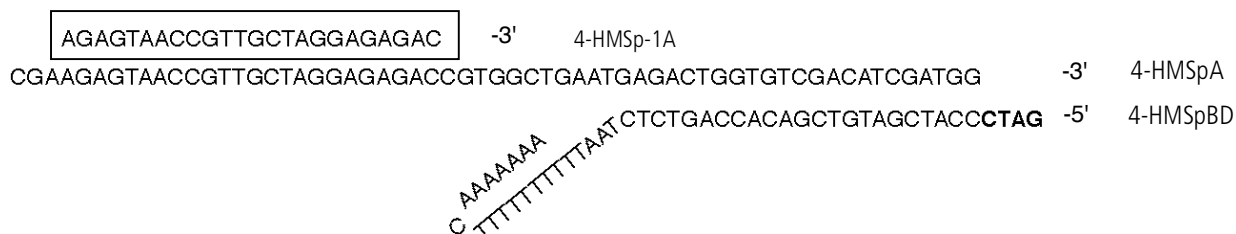


Abbildung 8. Splinkerette-Adaptor. Durch Annealing der beiden Oligonukleotide 4-HMSpA und 4-HMSpBD entsteht der Splinkerette-Adaptor mit der charakteristischen Haarnadelstruktur. Diese bildet sich am 3'-Ende des 4-HMSpBD-Oligonukleotids aus (TTTTTTCAAAAA). Die *Xho* II-Schnittstelle ist hervorgehoben (CTAG), das Splinkerette-Oligonukleotid 4-HMSp-1a ist umrandet.

10. PCR und Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die eingesetzten DNA bzw. cDNA Mengen für die Herstellung von Sonden für Southern und Northern Blots sind im jeweiligen Protokoll angeführt. Für die RT-PCR wurden 0,1 µl cDNA (siehe 6.) und für alle PCRs bzw. RT-PCRs 35 Zyklen eingesetzt (soweit nicht anders angegeben). Die Annealing Temperatur wurde für jedes verwendete Oligonukleotid empirisch bestimmt:

MMTV-LTR-Fw/ Rv:	58°C (493 bp)
RT-Wnt1-Fw/ Rv:	60°C (334 bp)
RT-Wnt2-Fw/Rv:	68°C (395 bp)
RT-Wnt3-Fw/ Rv:	60°C (860 bp)
RT-Wnt3a-Fw/ Rv:	60°C (522 bp)
RT-Wnt10b-Fw/Rv:	60°C (439 bp)
hu-Wnt3a-Fw/ Rv:	64°C (326 bp)
Northern-Wnt3a-Fw/ Rv:	60°C (220 bp)
Beta-Aktin-Fw/Rv:	60°C (590 bp)

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Die Intensität der Banden wurde mit einer Eagle Eye II™ Kamera und passender Software (Stratagene) gemessen.

11. Quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR wurde mit 0,25 µl humaner Tumor-cDNA und Kontroll-cDNA pro Reaktion und 50 PCR-Zyklen durchgeführt. Alle cDNAs wurden mit Hilfe von SYBR Green® Fluoreszenz von Zyklus 0-50 detektiert. Diese Berechnung kam für die Proben wie für die Kontroll- und Marker- cDNA gleichermaßen zu tragen. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide hu-Wnt3a-Fw und hu-Wnt3a-Rv produzieren ein Produkt mit 325 bp Länge. Für die PCR-Reaktion wurde der SYBR Green® PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems (USA) verwendet. Als Referenz wurden der TaqMan® β -actin und GAPDH Detection Reagent Kit (Applied Biosystems, USA) eingesetzt. Der Test wurde bei der Untersuchung zur Expression des *WNT3a*-Gens einmalig ausgeführt. Die Menge an *WNT3a*-mRNA wurde mit der Menge an β -Aktin-mRNA in jeder Probe quantifiziert.

12. Herstellung retroviraler Konstrukte

Die Herstellung retroviraler Konstrukte erfolgte über die Klonierung der vollständigen Maus *Wnt3a*-cDNA (1450 bp) in den retroviralen Vektor pBABE-PURO (5100 bp) (Geschenk von Renee von Amerongen, NKI, Amsterdam, Holland). Die *Wnt3a*-cDNA wurde von Karl Willert (UCSD, San Diego, USA) zur Verfügung gestellt und befand sich in dem pGEM-Plasmid-Vektor (Promega). Um gezielt die gewünschte Orientierung klonieren zu können, wurde die *Wnt3a*-cDNA aus dem pGEM-Vektor ausgeschnitten (1 U *EcoR* I) und in den Vektor pCR II (Invitrogen) kloniert. Durch Verdau mit je 1 U der Restriktionsenzyme *Bam*H I (Roche) und *Xho* I (Roche) wurde die *Wnt3a*-cDNA aus dem pCR II-Vektor geschnitten. Der retrovirale Vektor pBABE wurde mit je 1 U *Bam*H I (Roche) und *Sal* I (Roche) geschnitten und mit 3 U alkalischer Phosphatase (Shrimp, Roche) dephosphoryliert. Nach Auftrennung über ein 1%iges Agarosegel wurde die *Wnt3a*-cDNA sowie die pBABE-DNA aus dem Gel geschnitten und mit QIAex II Säulen gereinigt (QIA). In einem Verhältnis von 1:4 (pBABE-Vektor: *Wnt3a*-cDNA) wurde die *Wnt3a*-cDNA mit T4 DNA-Ligase (Roche) in den pBABE-Vektor in einem Gesamtvolumen von 10 µl ligiert (14°C, üN). Das Ligationsprodukt wurde in DH5 α Bakterien (Promega) mit der heat-shock Methode transformiert (nach Sambrook et al, 2000), mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) isoliert und durch einen Doppelverdau mit je 1 U *Not* I (Roche) und *Hind* III (Roche), sowie einen Doppelverdau mit je 1 U *Bam* HI (Roche) und *Hind* III (Roche) auf seine Orientierung hin überprüft. Von Klonen, die die gesuchte Länge und Orientierung aufwiesen, wurden Midi-Präparationen nach Angaben des Herstellers gefertigt und die DNA in 250 µl H₂O eluiert (QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN).

13. Transduktion von HC11-Zellen

Die murine Zelllinie HC11 wurde mit dem pBABE-PURO-Wnt3a Konstrukt oder mit dem leeren pBABE-PURO-Vektor transduziert. Für die Virusproduktion wurde die Verpackungszelllinie ϕ NX-E mit 10 µg retroviraler Vektor-DNA über die standardisierte Kalziumphosphat-Methode [84] transduziert. 10⁵ HC11-Zellen wurden in 6 cm Schalen ausplattiert und bei 37°C inkubiert, bis die Schale zu 60% mit Zellen bedeckt war.

Die Infektion erfolgte unter Verwendung von Polybrene (Clontech). Die pBABE-PURO- (Kontrolle) und pBABE-PURO-Wnt3a-transduzierten HC11-Zellen wurden 3 Wochen mit Puromycin als Selektionsmarker (4 µg/ml, Invitrogen) inkubiert.

14. Proliferationsassay

$6 \cdot 10^4$ Zellen wurden in dreifacher Ausführung in 6-well Platten überführt. Der Versuch wurde insgesamt zweimal wiederholt. Die Zellen wurden alle zwei Tage während einer 8-tägigen Periode gemessen. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche gelöst und in einem Casy 1 Model TTC Cell Counter and Analyzer System (Schärfe GmbH, Reutlingen, Deutschland) an den Tagen 2, 4, 6 und 8 gezählt. Das Medium in den verbleibenden Platten wurde jeweils an dem Tag erneuert, an dem gezählt wurde.

15. Soft Agar Assay

$6 \cdot 10^4$ HC11-pBABE- und HC11-Wnt3a-Zellen wurden in 2 ml 0,4%iger Low Melting Point Agarose (Sigma type VII) und DMEM (angereichert mit 10% FBS) resuspendiert. Die Zellen wurden in 6-well Platten überführt, die mit einer 1%igen Low Melting Point Agarose in DMEM (angereichert mit 10% FBS) beschichtet waren. Nach 28 Tagen Inkubation wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien gezählt.

16. Transplantation transduzierter HC11-Zellen *in vivo*

Pro Zelllinie wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in einem 1:2 Verhältnis mit Matrigel gemischt und bis zur Injektion auf 4°C gehalten. Es wurden jeweils Gruppen zu sechs Mäusen gebildet. Es wurden BALB/c⁺- und BALB/c-nu/nu-Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden durch Metofane-Inhalation (Metoxyfluran, Janssen-Cilag, Neuss) betäubt und die Zellen subkutan in die linke Flanke injiziert.

17. Immunohistochemie

HC11-pBABE- und HC11-Wnt3a-Tumore wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin fixiert. Die HE-Färbung umfasste eine Entparaffinierung in Xylol und eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (90%-70%). Danach wurde der Schnitt zuerst mit Hämalaun angefärbt, anschließend mit HCl-Alkohol differenziert und zuletzt mit Eosin (2%) versetzt.

18. Statistik

Signifikante Unterschiede zwischen den Tumorgrößen der HC11-pBABE- und HC11-Wnt3a-Tumore wurden mit dem T-Test für unabhängige Werte berechnet. Die Werte wurden für jeden Zeitpunkt ermittelt. Eine mögliche signifikante Korrelation zwischen MMTV-Insertionen und Wnt-Expression wurde mit dem Fishers Exakt Test untersucht.

Ergebnisse

I. Neue Tumorprogressionsgene in MMTV-induzierten BALB/c⁺-Mammatumoren

1. Etablierung eines neuen Mausmodells - die BALB/c⁺-Maus

Zur Identifizierung neuer Tumorprogressionsgene wurde ein neues Mausmodell etabliert. Ein besonderes Problem ist die Induktion von Metastasen, da Labormäuse meist am primären Mammatumor sterben bevor es zur Metastasebildung kommt. Für das neue Modell wurden BALB/c-Mäuse mit C3H-MMTV infiziert, wodurch die Tumorentstehung beschleunigt wird. Anstelle von Injektionen wurden BALB/c-Nachkommen zu laktierenden C3H-Mäusen gegeben und das Virus mit der Muttermilch übertragen. Die so infizierten BALB/c-Nachkommen wurden als BALB/c⁺-Mäuse bezeichnet. In dem neuen Mausstamm (BALB/c⁺-Mäuse) sollten Mammatumore bereits zu einem frühen Zeitpunkt induziert werden sowie Lungenmetastasen in hoher Zahl vorliegen. In der Tat entwickelten annähernd 100% der weiblichen BALB/c⁺-Zuchtmäuse Mammatumore zu einem relativ frühen Zeitpunkt (jünger als 1 Jahr) und mit einer relativ kurzen Latenzzeit von durchschnittlich 266 Tagen. Im Gegensatz dazu entwickeln nur 50-60% der nichtinfizierten weiblichen BALB/c-Zuchtmäuse Mammatumore mit einer durchschnittlichen Latenzzeit von 18 Monaten. Da nur 24% (12 von 50) der BALB/c⁺-Mäuse mit einem Primärtumor in der Brust auch mikroskopisch detektierbare Metastasen in der Lunge aufwiesen, wurde nach einer Methode gesucht, die die Frequenz für die Entwicklung von Lungenmetastasen erhöhen sollte. Als zuverlässige Methode hat sich neben der intravenösen Injektion die subkutane Injektion von transformierten Zellen erwiesen [85, 86]. Von 58 BALB/c⁺-Mäusen entwickelten 32 einen Primärtumor in der Mamma. Von diesen 32 Mäusen wurden die Lungen entnommen und mikroskopisch auf Metastasen untersucht. 16% der 32 Mäuse zeigten bereits unter dem Mikroskop sichtbare Metastasen in einem der beiden Lungenflügel (5/32). Der andere Lungenflügel wurde in Matrigel resuspendiert und s.c. in die linke Flanke von BALB/c⁺-Mäusen injiziert (Abbildung 9). Nach maximal sechs Monaten wurden die s.c. Tumore entnommen. Die Anzahl der subkutanen Tumore konnte so auf 41% erhöht werden (13/32). Kontrollinjektionen mit Lungen aus 10 Mäusen ohne Primärtumor ergaben in keinem Fall einen subkutanen Auswuchs. Durch diese einfache Methode ist es nun möglich, das Tumormaterial für längere Zeit in der Maus zu belassen und somit die Induktion von Tumorprogressionsgenen bzw. Metastasegenen in den BALB/c⁺-Mäusen zu steigern. Abbildung 10 zeigt einen Primärtumor (A) einer BALB/c⁺-Maus mit dem zugehörigen s.c.-Tumor (B) sowie die Biopsie der Injektionsstelle mit Lungengewebe einer BALB/c⁺-Maus ohne Primärtumor (C). Die Tumore wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und makroskopisch analysiert. Histologisch stellen sie gut differenzierte Tumore von Dunn Typ B dar (Abbildung 10). Ein weiterer Vorteil der s.c. Injektionen ist die Anreicherung von Tumorgewebe für genetische Analysen.

In der Regel weisen Lungenmetastasen, falls überhaupt mikroskopisch sichtbar, zu wenig Gewebe auf, um genetische Analysen durchführen zu können. Zur Verdeutlichung ist das Injektionsschema zur Gewinnung der s.c.-Tumore in Abbildung 9 schematisch dargestellt. BALB/c⁺-Mäusen mit einem Primärtumor wurden die Lungen entnommen, diese in Matrigel resuspendiert und wiederum s.c. in zwei BALB/c⁺- Mäuse injiziert. Nach maximal sechs Monaten wurden die Mäuse geopfert. Im Falle einer Tumorbildung, wurde dieser entnommen und mit dem zugehörigen Primärtumor analysiert. Somit bestand ein Tumorset immer aus einem Primärtumor und ein bis zwei s.c. Tumoren.

Insgesamt umfasste das Kollektiv 160 Tumorsets von denen 60 Tumorsets analysiert und die Ergebnisse in der hier präsentierten Arbeit vorgestellt werden.

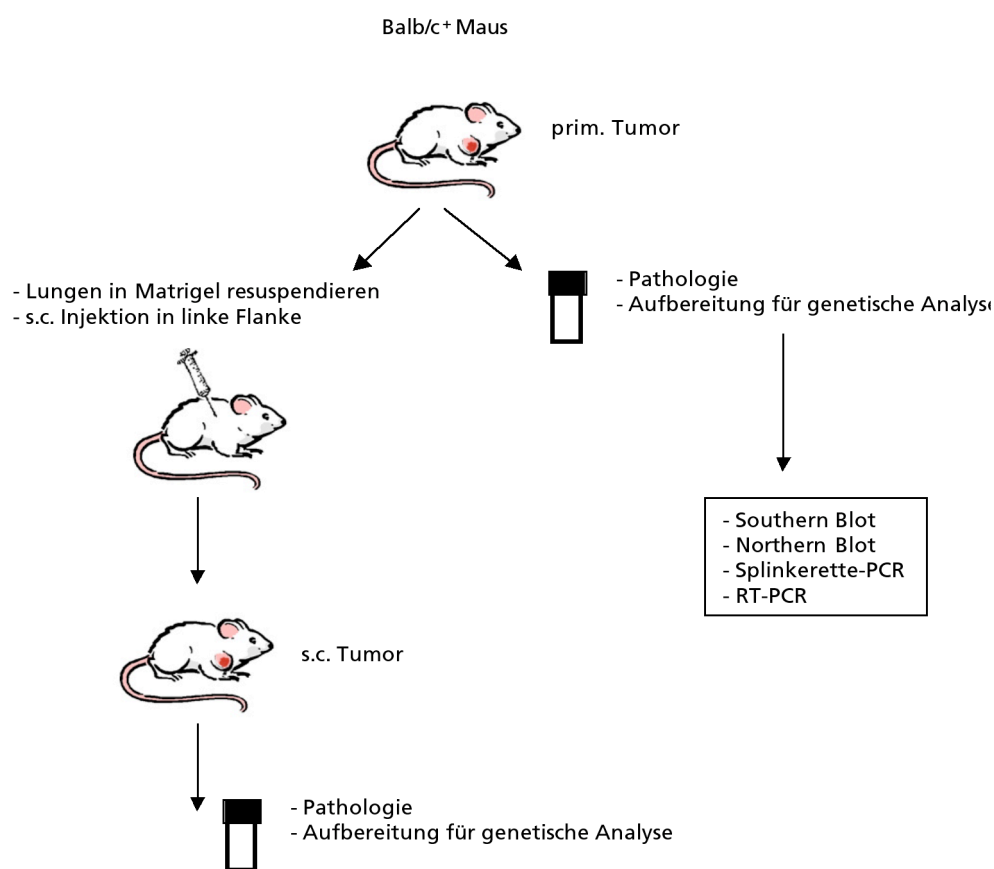


Abbildung 9. Injektionsschema. BALB/c⁺-Mäusen mit einem Primärtumor wurde nach Operation des Primärtumors die Lunge entnommen. Ein Teil des Primärtumors wurde in Formalin fixiert und für pathologische Untersuchungen aufbewahrt. Der Rest des Primärtumors wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Lungen wurden in Matrigel resuspendiert und s.c. in die linke Flanke zweier BALB/c⁺-Mäuse injiziert. Nach maximal sechs Monaten wurden die Mäuse geopfert und die s.c.-Tumore wiederum bei -80°C gelagert. Primärtumor und zugehöriger s.c.-Tumor bilden ein Tumorset und wurden genetisch weiter analysiert.

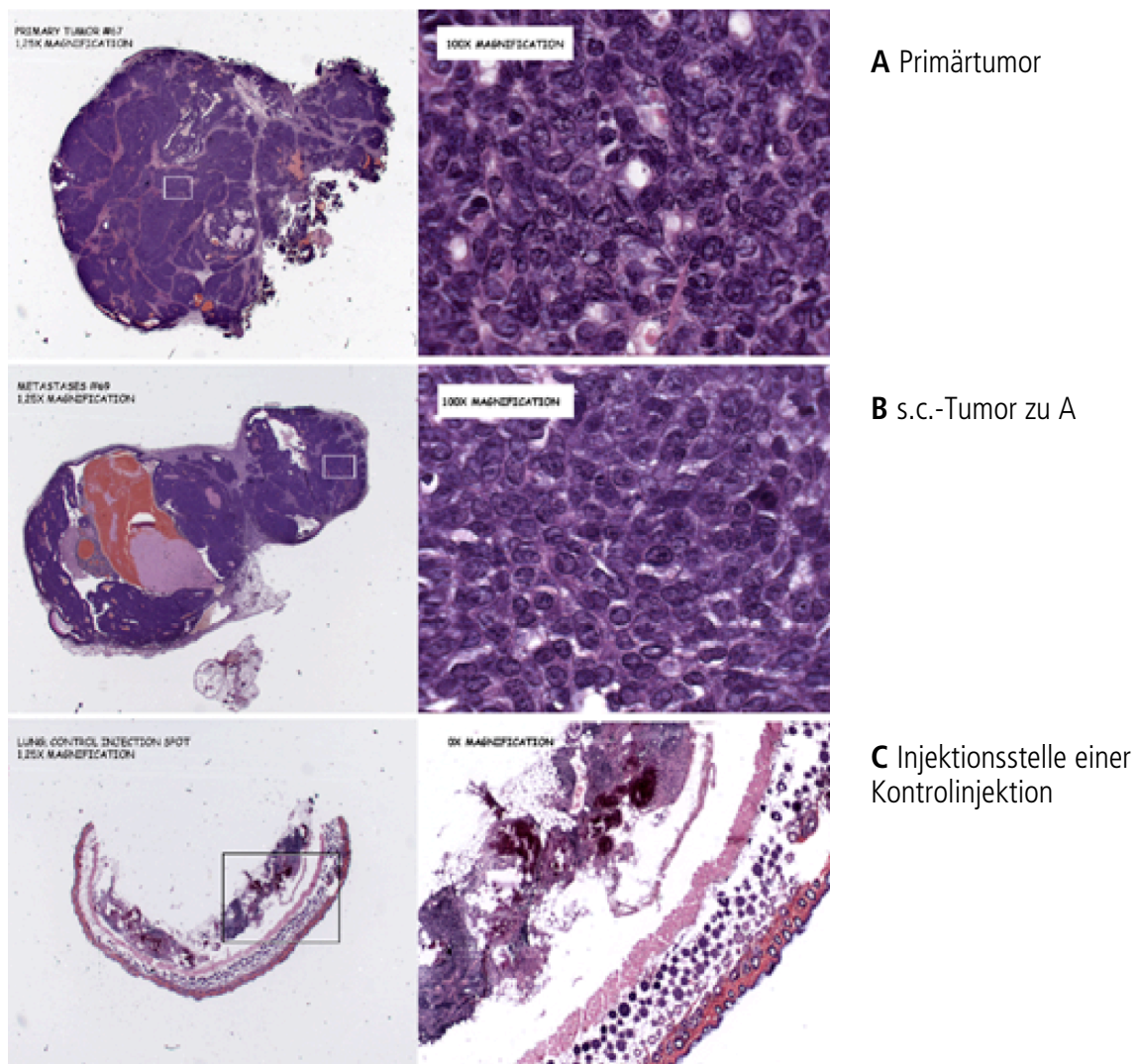


Abbildung 10. Histologie eines Primärtumors in der Mamma einer BALB/c⁺-Maus und deren zugehöriger subkutaner Tumor. Zum Vergleich wurden die Tumore mit H/E angefärbt und in 1,25facher- (linke Spalte) bzw. 100facher Vergrößerung (rechte Spalte) dargestellt. A = Primärtumor, B = s.c. Tumor zu Primärtumor A. C = Negativkontrolle. Die Lunge einer BALB/c⁺-Maus ohne Primärtumor wurde s.c. injiziert und die Injektionsstelle nach sechs Monaten entnommen, Formalin fixiert und H/E gefärbt.

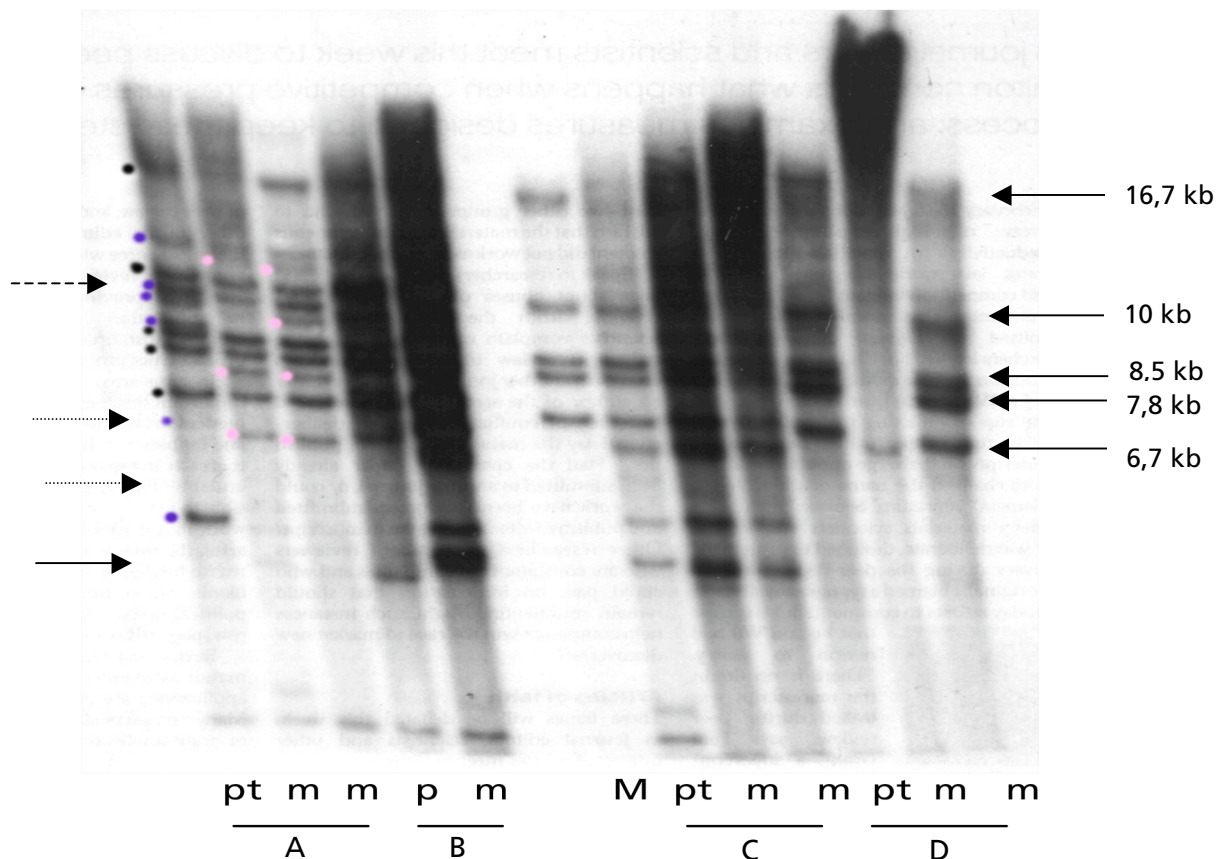


Abbildung 11. Southern Blot Analyse von BALB/c⁺-Mammatumoren. pt = Primärtumor, m = Metastase, M = Marker, A, B, C, D = Tumorset Nummern. Als Marker wurde Leber-DNA eingesetzt, die nur die endogenen Insertionen aufweist (Mtv 6 = 16,7 kb, Mtv-8 = 8,5 kb und 6,7 kb, Mtv-9 = 10 kb und 7,8 kb). Zusätzliche Insertionen in den Mammatumoren sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

2. Southern Blot Analyse der BALB/c⁺-Tumore

Um die BALB/c⁺-Tumore auf die Anzahl der zusätzlichen Integrationen zu kontrollieren, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Die genomische DNA von BALB/c-Mäusen enthält bereits zwei vollständige MMTV-Einheiten (Mtv-8 und Mtv-9) sowie eine unvollständige (Mtv-6). Da BALB/c⁺-Mäuse den gleichen genetischen Hintergrund wie BALB/c-Mäuse haben, können die endogenen Integrationen als Marker dienen. Durch den Verdau von genomischer DNA aus der Leber mit *EcoR* I lassen sich folgende 5 Banden auf dem Southern Blot erkennen: ein 16,7 kb großes Fragment für Mtv-6, ein 8,5 kb und ein 6,7 kb großes Fragment für Mtv-8, sowie ein 7,8 kb und 10kb großes Fragment für Mtv-9 [5]. Die endogenen Banden wurden als Positivkontrolle und Marker eingesetzt. Die genomische DNA von 30 Tumoren wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoR* I verdaut und mit einer MMTV-LTR-spezifischen Sonde hybridisiert. In Abbildung 11 ist ein solcher Southern Blot exemplarisch dargestellt.

Tumorset A weist Banden auf, die nur im Primärtumor (Abbildung 11, Pfeile mit durchgezogener Linie), nur in den s.c. Tumoren (Abbildung 11, Pfeile mit gepunkteter Linie) oder im ganzen Tumorset anzutreffen sind (Abbildung 11, Pfeil mit gestrichelter Linie). Dieses Muster wiederholte sich z.T. in weiteren Tumorsets. Andere Tumorsets zeigten keine Unterschiede bezüglich der Integrationen zwischen dem Primärtumor und den s.c. Tumoren (siehe auch Abbildung 11, Tumorset C). Nur zwei der 30 untersuchten Tumorsets zeigten keine zusätzlichen Integrationen auf dem Southern Blot.

Durchschnittlich wurden in den 30 analysierten Tumorsets sechs zusätzliche Integrationen im Primärtumor und 6 Integrationen in den s.c.-Tumoren angetroffen.

3. Etablierung einer Hochdurchsatzanalyse

Um eine Hochdurchsatzanalyse durchführen zu können, wurde das Splinkerette-PCR-Protokoll [87] für MMTV-Insertionen adaptiert (Abbildung 12). Diese Methode erlaubt die rasche Amplifikation und anschließende Sequenzierung von MMTV-DNA-flankierenden Bereichen und erleichtert somit das Auffinden neuer Integrationsstellen. Als gemeinsame Integrationsstelle oder CIS (Common Integration Site) bezeichnet man Integrationsstellen, die in mindesten zwei unabhängigen Tumoren gefunden werden. Die in der Nähe von CIS liegende Gene können durch eine veränderte Expression an der Tumorentstehung beteiligt sein.

Die genomische DNA aus BALB/c⁺-Tumoren wurde isoliert und mit *Xho* II verdaut. Dabei entstehen DNA-Fragmente, die das Provirus enthalten, und solche ohne MMTV-Integration. An die einzelnen Fragmente wurden die Adaptoren, sogenannte Splinkerette-Einheiten, ligiert. Diese Adaptoren entstehen durch Annealing zweier Oligonukleotide, wodurch eine *Xho* II-Schnittstelle an dem Ende des Adaptors gebildet wird, an dem die Ligation erfolgt. Da bei der Synthese der Oligonukleotide das 5'-Ende nicht phosphoryliert wird, kann nur das 3'-Ende des Adaptors an das 5'-Ende der genomischen DNA ligiert werden. Weiterhin wurde der Splinkerette-Adaptor so konstruiert, dass eine Auffüllreaktion am 3'-Endes des unteren Oligonukleotids (4-HMSpBD) durch die DNA-Polymerase vermindert wird. Dies geschieht durch die Ausbildung einer Haarnadelstruktur an der TTTTTCACAAAAA-Sequenz des unteren Adaptor-Stranges (Abbildung 8) [88].

Um die Lage der Fragmente zu bestimmen, die eine MMTV-Integration beinhalten, kann man sich eine PCR zu Nutze machen, die die genomische DNA zwischen MMTV-LTR und Splinkerette-Adaptoren amplifiziert. Dies geschieht mit Hilfe von Oligonukleotiden, die zum einen spezifisch an den Splinkerette-Adaptor und zum anderen an die LTR-Sequenz des Provirus binden. Ausgehend von der MMTV-Sequenz und dem MMTV-spezifischen Oligonukleotid beginnt die Amplifikation der DNA-Fragmente, die neben dem Adaptor auch den 5'-LTR-Bereich aufweisen. Da das splinkerette spezifische Oligonukleotid dieselbe Sequenz aufweist wie der Adaptor, kann es nur an die Sequenzen binden, die von dem MMTV-Oligonukleotid zuvor neu synthetisiert wurden. Um die Spezifität zu erhöhen und unspezifische, lineare PCR-Produkte zu verringern, wurden die PCR-Produkte der ersten PCR (Abbildung 13, links) auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, isoliert und mit einem zweiten, versetzt bindenden MMTV-Oligonukleotid erneut amplifiziert (siehe auch Material und Methoden).

Nachdem die Produkte der zweiten PCR auf einem Agarosegel aufgetrennt und isoliert wurden, erfolgte die Sequenzierung der amplifizierten Bereiche (Abbildung 13, rechts). Nur die Sequenzen, die noch einen Teil des LTR-Oligonukleotids aufwiesen, wurden ausgewertet.

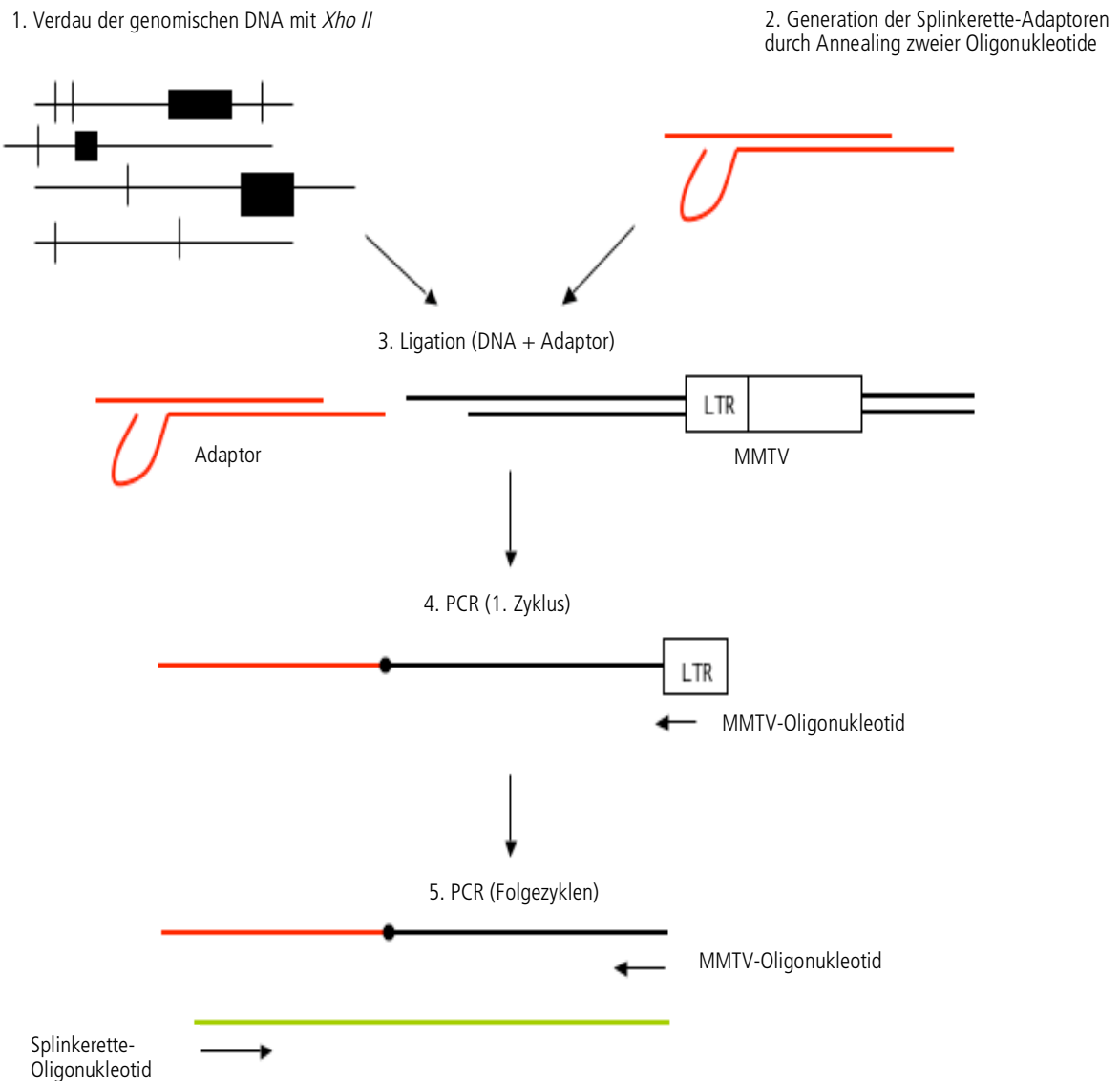


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Splinkerette-PCR. Um die MMTV-Insertionsstellen zu bestimmen, wird genomische DNA zunächst mit *Xho II* verdaut. Dadurch erhält man DNA-Fragmente mit proviralen Sequenzen, DNA-Fragmente ohne Provirus und reine MMTV-Fragmente. Weiterhin wurden Splinkerette-Adaptoren generiert, die an das 5'-Ende der verdauten DNA ligieren. Da die Sequenzen von MMTV und Adaptor bekannt sind, kann man die Fragmente, die beide Sequenzen enthalten, amplifizieren. Die PCR beginnt von der LTR-Region des Provirus aus, somit werden nur die Fragmente amplifiziert, die provirale Sequenzen enthalten. In der zweiten PCR-Runde kann das Splinkerette-Oligonukleotid an die neu amplifizierte DNA (grüner Bereich) binden. Somit kann in den Folgerunden die mit einem MMTV-Adaptor flankierte DNA exponentiell vermehrt werden. DNA-Fragmente ohne MMTV-Sequenz können nicht amplifiziert werden, da das MMTV-Oligonukleotid, das für den Start notwendig ist, nicht binden kann. Um die Spezifität zu erhöhen, folgte eine zweite PCR mit einem versetzt bindendem MMTV-Oligonukleotid.

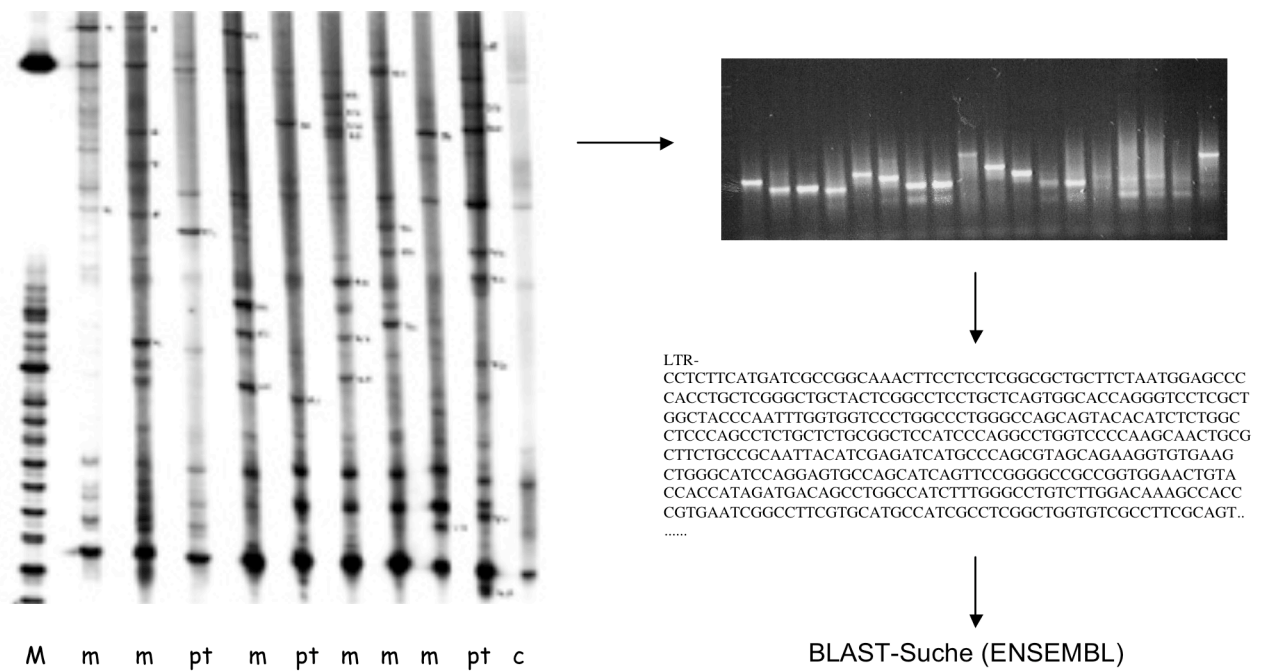


Abbildung 13. Splinkerette-PCR. pt = Primärtumor, m= Metastase, c = Leber DNA, M = 100 bp Marker, Übersicht über die einzelnen PCRs. Links ist ein Polyacrylamidgel mit den PCR Produkten der ersten Reamplifikation dargestellt. Wie schon im Southern Blot gesehen, sind neben den endogenen auch zusätzliche Integrationen zu erkennen. Als Marker für die endogenen Insertionen wurde erneut Leber-DNA eingesetzt. Die zusätzlichen Insertionen wurden gekennzeichnet, aus dem Gel ausgeschnitten und die extrahierte DNA erneut amplifiziert. Die PCR Produkte sind auf dem Agarosegel (rechts) zu sehen. Die leiterartige Struktur, die schon auf dem Polyacrylamidgel deutlich ist, findet sich auch nach der zweiten Reamplifikation wieder. Nach Entfernung der PCR Produkte aus dem Gel, Reinigung und Sequenzierung wurden die informativen Sequenzen mit Datenbanken wie Ensembl verglichen.

4. Identifizierung neuer MMTV-Integrationsstellen

Mit den 5' MMTV-flankierenden Sequenzen aus der Splinkerette-PCR wurde eine Sequenzanalyse (Blast) in der Ensembl Datenbank (NCBI build 32) durchgeführt. Die Positionen der einzelnen Sequenzen wurden anschließend gegeneinander verglichen.

Die Analyse von 60 Tumorsets resultierte in 594 auswertbaren Sequenzen, die wiederum 89 Gene identifizierten, die durch MMTV flankiert sind. 80 dieser Gene wurden nur einmal gefunden und stellen somit einfache retrovirale Integrationsstellen dar (RIS) (Tabelle 2). Aber auch 9 gemeinsame Integrationsstellen (CIS) konnten gefunden werden (Tabelle 3). Dazu gehören die bereits bekannten CIS *Wnt1*, *Wnt3* und *Fgf3*, aber auch neue CIS wie *Wnt3a*, *Slc25a10*, *Ramp1*, *Edg5*, *Trnt1* und *KV2B_MOUSE*.

Die *Wnt*- und *Fgf*-Gene stellen zwei große Klassen der identifizierten Gene dar. Weiterhin lassen sich Gene finden, die für mitochondriale Funktionen kodieren (40S ribosomales Protein, *Mrpl19*, *Slc25a10*, *Tk2* und *Trnt1*). Eine weitere große Gruppe sind Gene, die an der Bildung des Zytoskeletts oder der Zelladhäsion beteiligt sind (*Herc1*, *Itgb4*, *Ncam2*, *Bin3*, *Myotilin*, *Rab2* und *Rab3c*). Auch Wachstumsfaktoren (*Ifnar2*, *Ier5*, *Egf15*, *Peli1* und *Ppp2r2b*), Transkriptionsfaktoren (*Zfp352*, *Prdm5*, *Ebf3* und *Rfx3*), Rezeptoren (*Gria2*, *Esrrb*, *TLR9*, *Oprk1* und *Ramp1*) und Bindeproteine (*Chordc1*, *Spock2*, *Odz1*, *Tmpo*, *Gm672*, *Rbms3* und *Trnt1*) konnten gefunden werden.

Tabelle 2. RIS

Gen	Bezeichnung	Funktion
<i>Auts2</i>	Autism susceptibility candidate 2	Unbekannt
<i>Herc1</i>	Hect domain	Zytoskelett
<i>FgfR1</i>	Fgf receptor 1	Fgf-Signalweg
<i>Itgb4</i>	Integrin β 4	Zytoskelett
<i>Fzd10</i>	Frizzled Homolog 10	Wnt-Signalweg
<i>Tetraspan NET-2</i>	Transmembran-Protein	Unbekannt
<i>40S ribosomales Protein</i>		Mitochondrien
<i>Tmem4</i>	Transmembran-Protein	Unbekannt
<i>ENSMUS43820</i>		Unbekannt
<i>ENSMUSG19868</i>		Unbekannt
<i>Zfp352</i>	Zinkfinger-Protein	Transkription
<i>NM_177014</i>		Unbekannt
<i>Mrpl 19</i>	60S ribosomales Protein	Mitochondrien
<i>Daz1</i>	deleted in Azoospermia	Unbekannt
<i>Ifnar2</i>	Interferon receptor 2	Wachstumsfaktor
<i>Myotilin</i>	sarcomeric protein binding to actin	Zytoplasma
<i>Prdm5</i>	PR-domain zink finger protein 5	Transkription, Onkogen
<i>Bin3</i>	Bridging protein 3	Zytoskelett
<i>Trim 47</i>	Tripartite motif	Unbekannt
<i>COP9</i>	Signalosome	Regulator
<i>ENSMUSG48162</i>		Unbekannt
<i>Znt8</i>	Zink transporter 8	Kation-Transporter
<i>Ccbp2</i>	Chemokine binding protein 2	Signal-Transduktion
<i>Trim 32</i>	Tripartite motif	Anti-Apoptotisch
<i>Fbxw4</i>	F-box and WD-40 domain protein	Unbekannt
<i>Chordc1</i>	Zink binding protein 1	Zinkbindendes Protein
<i>Tk2</i>	Thymidine kinase 2	Mitochondrial
<i>Atp10a</i>	ATPase	Transporter

<i>Gria2</i>	Glutamate receptor	Rezeptor
<i>Spock2</i>	Testican 2	Kalziumbindendes Protein
<i>Dlgn2</i>	Discs, large homolog 2	Unbekannt
<i>ENSMUSG53168</i>		Unbekannt
<i>ENSMUSG66649</i>		Unbekannt
<i>Esr1</i>	Estrogen receptor 1	Rezeptor
<i>Pmp2</i>	Plasma membrane proteolipid	Transporter
<i>Rab2</i>	Ras oncogene member 2	Zytoskelett
<i>Rbm9</i>	RNA binding motif protein 9	Unbekannt
<i>Ugt1a1</i>	Glycosyltransferase	Unbekannt
<i>Ebf3</i>	Early B-cell factor 3	Transkription
<i>Fgf4</i>	Fibroblast growth factor 4	Fgf-Signalweg
<i>Rab3c</i>	Ras family member 3c	Zytoskelett
<i>Ptdss1</i>	Phosphatidylserine synthase	Transferase
<i>TLR9</i>	Toll-like receptor	Rezeptor
<i>Fgf8</i>	Fibroblast growth factor 8	Fgf-Signalweg
<i>Oprk1</i>	Opioid receptor kappa 1	Rezeptor
<i>Diap2</i>	Drosophila inhibitor of apoptosis	Apoptose
<i>Abca4</i>	ATP-binding cassette	Transporter
<i>Rfx3</i>	Regulatory factor x	Transkription
<i>ENSMUSG32985</i>		Unbekannt
<i>ENSMUSG62370</i>		Unbekannt
<i>Bys1</i>	Blastomyces	Unbekannt
<i>Ier5</i>	Immediate early response	Wachstumsfaktor
<i>Hhip</i>	Hedgehog interacting protein precursor	Hedgehog-Signalweg
<i>Pus7</i>	Pseudouridylate synthase 7 homolog	Unbekannt
<i>ENSMUSG40514</i>		unbekannt
<i>Kit</i>	Kit oncogene	Onkogen
<i>Odz1</i>	Odd OZ/ten-m homolog 1	Heparinbindendes Protein
<i>Idb4</i>	Inhibitor of DNA binding 4	Regulator, Tumor-Suppressor
<i>Rnf130</i>	Ring finger protein 130	Apoptose
<i>Egf15</i>	Early growth factor 15	Wachstumsfaktor
<i>ENSMUSG36356</i>		Unbekannt
<i>Ndufs4</i>	NADH dehydrogenase	Mitochondrien
<i>Ppp2r2b</i>	Protein phosphatase 2	Wachstumsfaktor
<i>Tmpo</i>	Thymopoietin	Laminbindendes Protein
<i>Chst11</i>	Carbohydrate sulfotransferase11	Katalysator
<i>ENSMUSG70654</i>		Unbekannt
<i>Gm672</i>	Gene model 672	RNAbindendes Protein
<i>Sync1</i>	Synaptic nuclear envelope1	Unbekannt
<i>Sept11</i>	Septin 11	Nukleotidbindendes Protein
<i>Ag1gpb1</i>	AP1 gamma subunit binding protein	Unbekannt
<i>Cacna1b</i>	Calcium channel	Kalzium-Kanal
<i>Rbms3</i>	RNA binding motif	Bindeprotein

<i>Psg20</i>	Pregnancy-specific glycoprotein 20	Unbekannt
<i>Tnfrsf11a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily	Überlebensfaktor
<i>Ncam2</i>	Neural cell adhesion molecule 2	Zytoskelett
<i>KAC_Mouse</i>	Ig kappa chain C region	Immunglobulin
<i>Tnc</i>	Tenascin C	Zytoskelett
<i>Ddn</i>	Dendrin	Unbekannt
<i>Peli1</i>	Pellino	Wachstumsfaktor

Tabelle 3. CIS

Gen	Bezeichnung	Funktion
<i>Wnt1</i>	Wingless homolog 1	Wnt-Signalweg
<i>Wnt3</i>	Wingless homolog 3	Wnt-Signalweg
<i>Wnt3a</i>	Wingless homolog 3a	Wnt-Signalweg
<i>Fgf3</i>	Fibroblast growth factor 3	Fgf-Signalweg
<i>Edg5</i>	Sphingolipid G-protein coupled	Rezeptor
<i>Slc25a10</i>	Mitochondrial dicarboxylate carrier	Mitochondrien
<i>Ramp1</i>	Receptor activity modifying protein	Rezeptor
<i>KV2B_Mouse</i>	g kappa chain V-II region VKappa167 precursor	Unbekannt
<i>Trmt1</i>	tRNA nucleotidyltransferase	Bindeprotein

II. Analyse von *Wnt3a* in murinen und humanen Mammatumoren

1. Der *Wnt3a*-Genlokus als neue CIS

Die Splinkerette-PCR-Analyse von 120² MMTV-induzierten Mammatumoren identifizierte neben dem bereits bekannten *Wnt1*- und *Wnt3*-Gen auch *Wnt3a* als neue CIS. Insgesamt konnten 6 verschiedene Tumore mit einer MMTV-Integration in der unmittelbaren Nähe des *Wnt3a*-Genlokus auf Chromosom 11 gefunden werden (6%) (Abbildung 14). Untersuchungen ergaben, dass MMTV in 5 Tumoren (#2, #14, #17, #84 und #92) stromaufwärts und in transkriptionell entgegengesetzter Richtung relativ zum *Wnt3a*-Genlokus inseriert war. Es ist somit wahrscheinlich, dass *Wnt3a* aufgrund eines Verstärkermechanismus in diesen Tumoren aktiviert wurde (siehe auch Abbildung 6). Wie bereits beschrieben, ist diese Art der Stimulation bei einem Großteil der Gene zu beobachten, die durch MMTV-Integration aktiviert werden (z. B. *Wnt1*) [89]. Neben den 5 Tumoren, die eine Integration stromaufwärts aufwiesen, wurde auch ein Tumor mit einer Integration im ersten Intron und in gleicher transkriptioneller Orientierung wie die des *Wnt3a*-Gens gefunden (#110). In diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass eine Genaktivierung aufgrund einer Promotor-Insertion vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Wnt3a* eine neue CIS in MMTV-induzierten Mammatumoren darstellt und in 5% der 120 untersuchten Tumore durch MMTV flankiert ist.

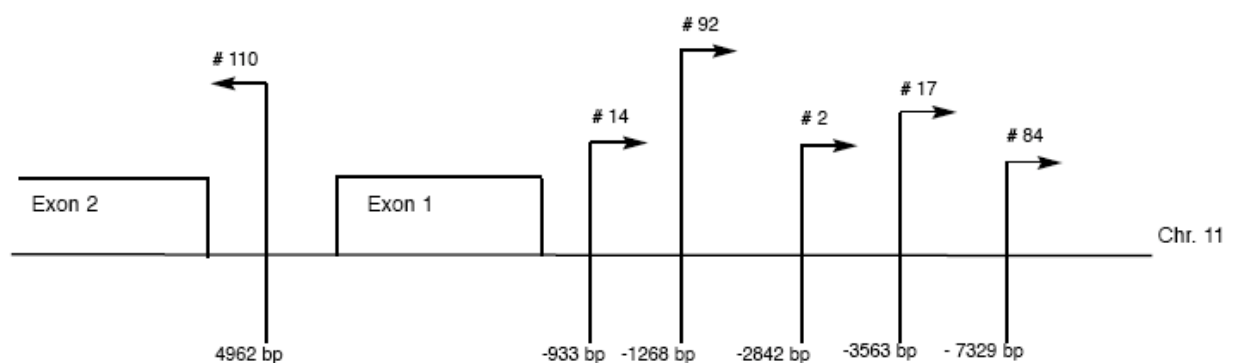


Abbildung 14. MMTV-Insertionen im *Wnt3a*-Genlokus. In sechs unabhängigen Tumoren wurde eine MMTV-Integration in der Nähe des *Wnt3a*-Genlokus gefunden. Oberhalb des Pfeils werden die Tumornummern angegeben, die Pfeilspitze zeigt die transkriptionelle Orientierung an. Die Lage der Integration bezogen auf den transkriptionellen Start des *Wnt3a*-Gens ist unterhalb des Pfeils angegeben.

² 60 Tumorsets bearbeitet von Melanie Kimm, 60 Tumorsets bearbeitet von Vassiliki Theodorou

2. *Wnt3a*-Expression in Tumoren mit MMTV-Integration im *Wnt3a*-Genloкус

Für die Expressionsanalyse von *Wnt3a* in den Mammatumoren, in denen eine provirale Integration in unmittelbarer Nähe des *Wnt3a*-Genloкус auftrat, wurde ein Northern Blot angewendet (Abbildung 14). Dabei wurden unterschiedliche Mengen $\text{RNA}_{\text{total}}$ (je nach Verfügbarkeit zwischen 31 μg und 132 μg) und Sonden gegen *Wnt3a* und β -Aktin eingesetzt. Analysiert wurden die drei Tumorsets #11, #14 und #32. Während β -Aktin in allen Tumoren exprimiert vorlag, konnte *Wnt3a* nur in Tumorsset #32 gefunden werden sowie in einem Tumor von Tumorsset #14 (Abbildung 15). In diesem Tumor wurden 132 μg $\text{RNA}_{\text{total}}$ für den Northern Blot eingesetzt. Im Tumorsset #32 ist zwar trotz geringerer Menge an $\text{RNA}_{\text{total}}$ ein *Wnt3a*-Signal in zwei Tumoren erkennbar (49 μg bzw. 56 μg $\text{RNA}_{\text{total}}$), das aber im Vergleich zu dem Tumor mit 93 μg $\text{RNA}_{\text{total}}$ sehr schwach ist. Da die Northern Blot Analyse zu große RNA-Mengen forderte und nur begrenzte Mengen Tumormaterial für die RNA-Analysen zur Verfügung standen, wurde die Frage, ob die MMTV-Integrationen im *Wnt3a*-Genloкус tatsächlich zur Aktivierung von *Wnt3a* geführt haben, mit Hilfe von RT-PCR-Analyse geklärt. Dazu wurden 5 μg $\text{RNA}_{\text{total}}$ für die cDNA Synthese verwendet, mit der im Anschluss die RT-PCR durchgeführt wurde.

Vier der fünf Tumore (#14, #17, #84 und #110) mit MMTV-Integration im *Wnt3a*-Genloкус zeigten eine *Wnt3a*-Expression (Abbildung 16). Nur in Tumor #92 konnte keine *Wnt3a*-Expression gefunden werden. Tumor #2 konnte nicht auf eine *Wnt3a*-Expression hin untersucht werden, da kein Tumormaterial mehr für die RNA-Analyse zur Verfügung stand. Obwohl in Tumor #110 die Insertion in Intron 1 liegt, wurde ein vollständiges *Wnt3a*-Transkript gebildet. Da die Möglichkeit besteht, dass eine Integration außerhalb des Bereichs liegt, der mit PCR noch ermittelt werden kann und somit ein Tumor keine Integration nach der Splinkerette-PCR aufweist, aber dennoch *Wnt3a* exprimiert, wurden weitere 45 zufällig ausgewählte Mammatumore auf die Expression von *Wnt3a* mittels RT-PCR getestet.

Die Analyse zeigt, dass weitere sechs Tumorsets (#11, #24, #32, #39, #41 und #83) eine *Wnt3a* Expression aufwiesen (Abbildung 17). Somit wurden insgesamt 10 von 48 Tumoren (21%) mit einer positiven *Wnt3a*-Expression identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass *Wnt3a* in der Tat eine wichtige Rolle in der Tumorigenese von MMTV-induzierten Mammatumoren spielt.

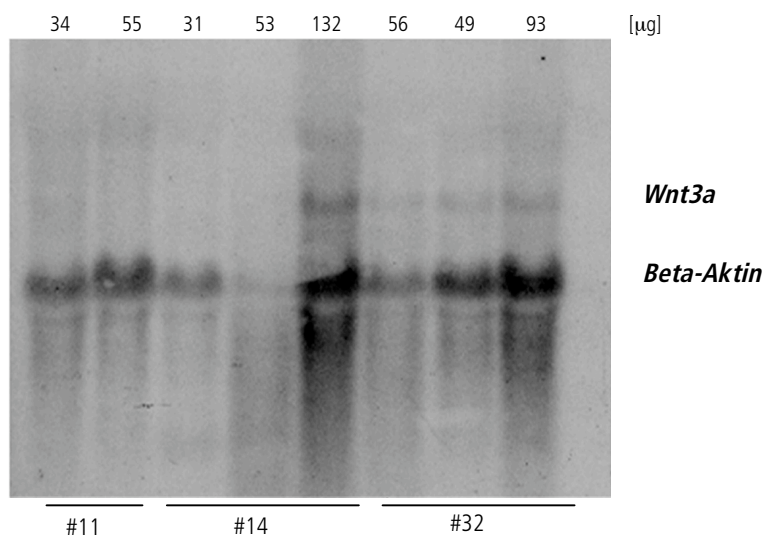


Abbildung 15. Northern Blot. Es wurden je nach Verfügbarkeit 31-132 μg $\text{RNA}_{\text{total}}$ verschiedener Mammatumore eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde Beta-Aktin verwendet, # = Tumorseite Nummer.

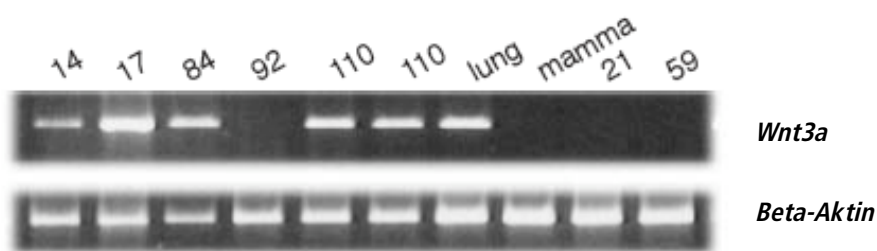


Abbildung 16. *Wnt3a*-Expressionsanalyse. RT-PCR-Analyse der Mammatumore, die eine MMTV-Integration im *Wnt3a*-Genlokus aufwiesen. Lunge = Positivkontrolle, jungfräuliche Mamma = Negativkontrolle, #21/#59 = Tumore ohne MMTV-Integration im *Wnt3a*-Genlokus.

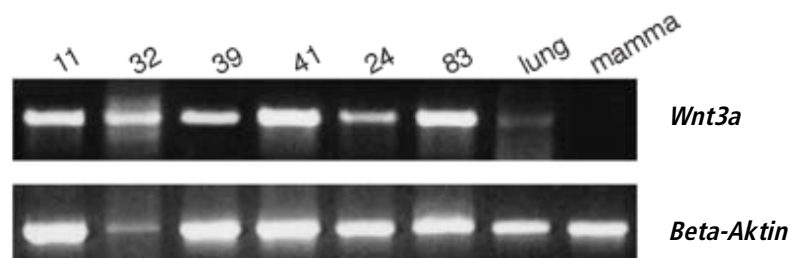


Abbildung 17. RT-PCR-Analyse von 50 Mammatumoren bezüglich *Wnt3a*-Expression. Es konnten sechs weitere Mammatumore mit einer *Wnt3a*-Expression identifiziert werden. Nur *Wnt3a*-positive Tumore sind abgebildet. Lunge = Positivkontrolle, Mamma = Negativkontrolle

3. *Wnt3a* transformiert HC11-Mamma-Epithelzellen *in vitro*

Es wurde bereits gezeigt, dass *Wnt3a* die murine Epithelzelllinie C57MG *in vitro* transformieren kann [90]. [91] Das tumorigene Potential des Gens wurde aber bisher noch nicht nachgewiesen. Im Zuge dieser Arbeit wurde der Effekt von *Wnt3a* auf die Wachstumsrate und auf das nicht adhärenzte Wachstum von Epithelzellen *in vitro* untersucht. Dazu wurde der Klon D7 der Mamma-Epithelzelllinie HC11 mit *Wnt3a* transduziert, wodurch die Expression von *Wnt3a* in den HC11-Zellen ausgelöst wurde.

Die HC11-Zellen stammen von normalem Mammaepithel schwangerer BALB/c-Mäuse ab, haben einen inaktiven p53 Signalweg, wachsen *in vitro* mit hoher Geschwindigkeit und bilden eine teilweise kontakthibierende Monoschicht [83]. HC11-Zellen sind etabliert und wurden bereits für den Onkogenitätsnachweis verwendet [34, 92, 93], können aber nach einer langen Latenzzeit (> 5 Monate) auch Tumore *in vivo* auslösen [94]. Um zu vermeiden, dass die HC11-Zellen spontane Mutationen anreichern, die das Tumorstadium beschleunigen, wurden Klone von der Zelllinie angefertigt und subkutan in BALB/c⁺-Mäuse injiziert. Der Klon D7 zeichnete sich durch eine Tumoraltenzzeit von sechs Monaten und das Ausbleiben von Lungenmetastasen aus. Dieser Klon wurde für die nachfolgenden Versuche verwendet, zum einfacheren Verständnis wurden die Zellen weiterhin als HC11-Zellen bezeichnet, auch wenn es sich um HC11-D7-Zellen handelt.

Die Transduktion erfolgte mit zwei Konstrukten; zum einen wurde der retrovirale Vektor pBABE, in dem die vollständige *Wnt3a*-cDNA einkloniert worden war (HC11-*Wnt3a*) transduziert und zum anderen der leeren pBABE-Vektor (HC11-pBABE, Negativkontrolle). Selektion der transduzierten Klone erfolgte über eine Puromyzin-Resistenz im pBABE-Vektor. Die Expression von *Wnt3a* wurde mit RT-PCR-Analyse überprüft (Abbildung 18) und bestätigte, dass nur die HC11-*Wnt3a*-Zellen *Wnt3a* exprimieren. Mikroskopische Untersuchungen zeigten keinerlei Unterschiede bezüglich der Morphologie zwischen den HC11-Zellen und den HC11-pBABE-Zellen. Die HC11-*Wnt3a*-Zellen hingegen wiesen deutlich eine gestrecktere Form auf, waren weniger kuboidal und zeigten die Tendenz, sich schichtweise aufzustapeln (Abbildung 19). Die hier beschriebenen morphologischen Veränderungen in den HC11-*Wnt3a*-Zellen sind in Einklang mit den Studien von Wong et al. [90], in denen die Mamma-Epithelzelllinie C57MG mit *Wnt3a* transfiziert wurde und entsprechen den Charakteristika für transformierte Zellen. Da die HC11-*Wnt3a*-Zellen somit den Anforderungen entsprachen, konnten die Untersuchungen hinsichtlich des onkogenen Potentials von *Wnt3a* fortgeführt werden. Bereits das Wachstum von HC11-*Wnt3a*-Zellen in z.T. mehreren Schichten deutet darauf hin, dass diese Zellen auch dann noch wachsen können, wenn sie keine Möglichkeit zum Anheften haben. Dieses nicht adhärenzte Wachstum ist eine Möglichkeit, das tumorigene Verhalten von Zellen zu messen. Dazu wurde eine Transformationsanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen in mit Medium versetzten Agar gegeben und das Wachstum von Kolonien nach 28 Tagen Inkubation ausgewertet. Insgesamt wurden 6×10^4 Zellen pro Zelllinie (HC11-pBABE und HC11-*Wnt3a*) ausplattiert und nach 28 Tagen ausgezählt, wobei beide Zelllinien Kolonien aufwiesen: HC11-*Wnt3a*-Zellen hatten 320 Kolonien gebildet, die HC11-pBABE-Zellen hingegen nur 175 (Abbildung 20). Das Experiment wurde zur Kontrolle ein zweites Mal durchgeführt. Wiederum bildeten die HC11-*Wnt3a*-Zellen mehr Kolonien (n=358) als die HC11-pBABE-Zellen (n=208). Der gemittelte Wert beider Versuche wurde in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien war die Größe der gebildeten Kolonien (Abbildung 20). HC11-Wnt3a-Kolonien weisen schätzungsweise einen 2-3 Mal größeren Umfang auf als die HC11-pBABE-Kolonien. Dies zeigt, dass *Wnt3a* das Wachstum von Zellen *in vitro* fördert und zur Transformation der Zellen fähig ist.

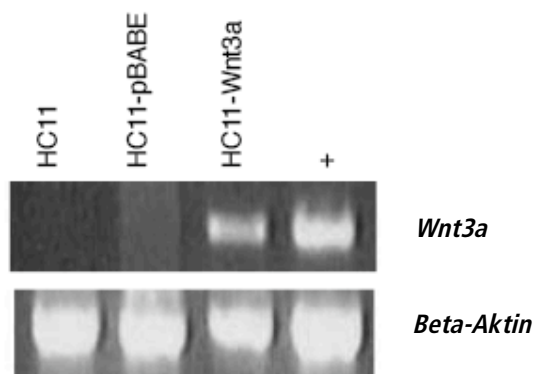


Abbildung 18. RT-PCR-Analyse der HC11-pBABE und HC11-Wnt3a-Zellen. HC11 = Negativkontrolle, *Wnt3a*-cDNA = Positivkontrolle. Beta-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die *Wnt3a*-cDNA stammt aus einer Plasmid-Präparation.

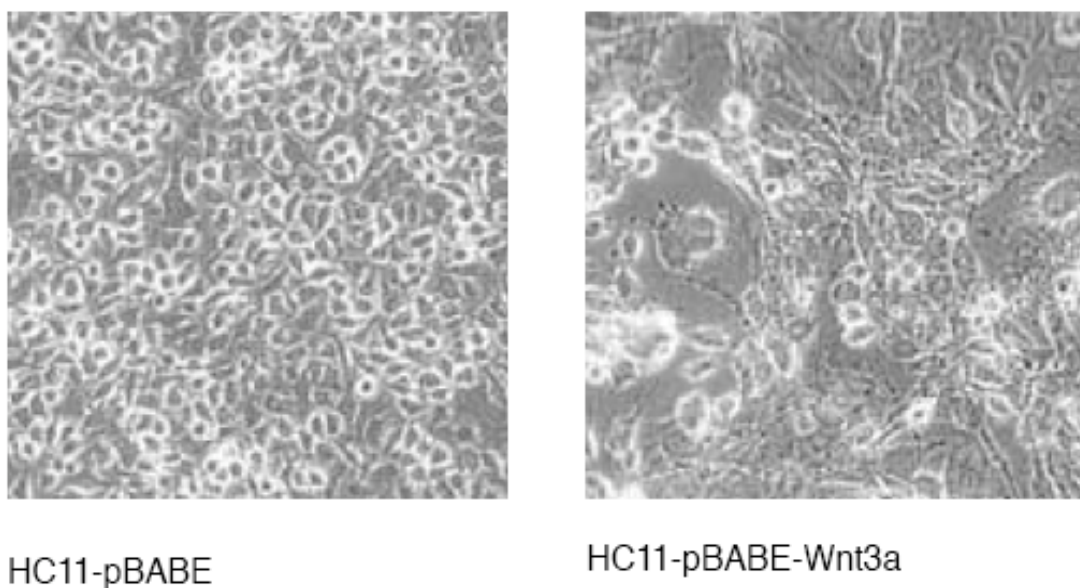


Abbildung 19. Zellmorphologie von HC11-pBABE und HC11-Wnt3a-Zellen *in vitro*. HC11-Wnt3a-Zellen sind deutlich gestreckter als HC11-pBABE-Zellen und haben eine Tendenz sich anzuhäufen.

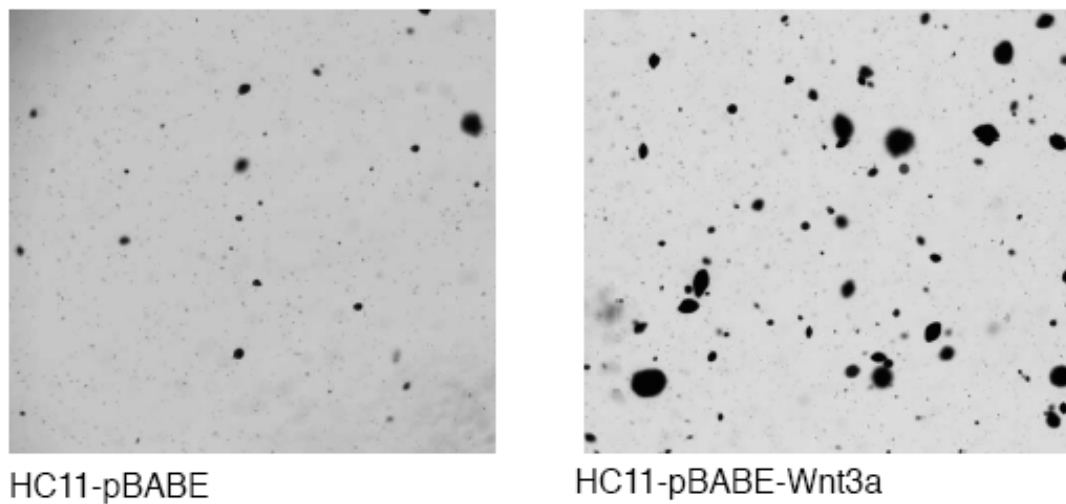


Abbildung 20. Soft Agar Assay. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Kolonien, die die HC11-pBABE-Zellen bildeten, deutlich kleiner sind als die der HC11-Wnt3a-Zellen.

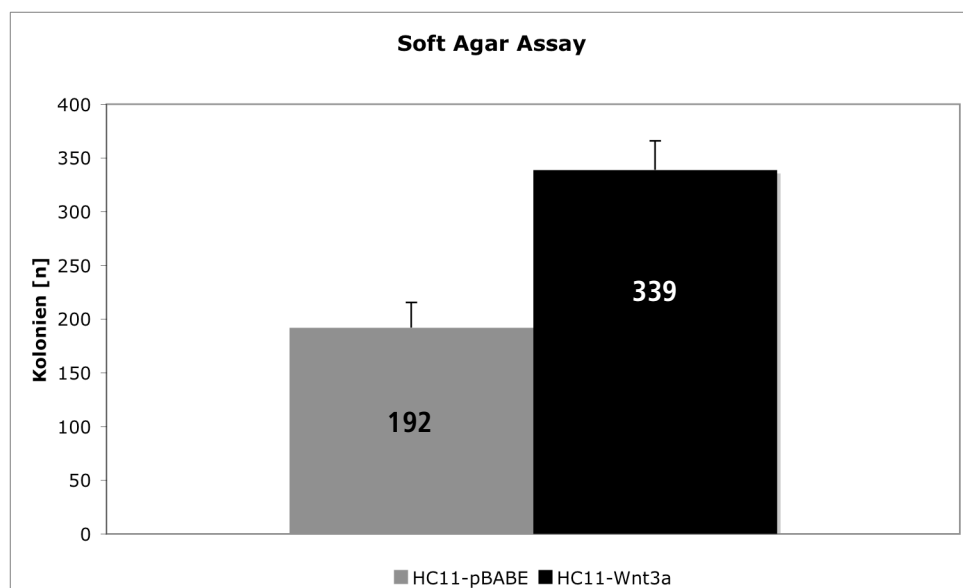


Abbildung 21. Soft Agar Assay. Gemittelt aus zwei Versuchen bildeten HC11-pBABE-Zellen 192 Kolonien, HC11-Wnt3a-Zellen 339 Kolonien. Graphische Darstellung der Kolonien, die in Abbildung 20 dargestellt sind.

4. *Wnt3a*-Expression erhöht die Tumorigenität von HC11-Zellen *in vivo*

Zur Überprüfung der Tumorigenität von *Wnt3a in vivo* wurden subkutane Transplantationen der HC11-*Wnt3a*- und HC11-pBABE-Zellen in Mäusen durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurden pro Zelllinie 10 BALB/c⁺-Mäuse injiziert. Nach acht Wochen wurden die subkutanen Tumore, die sich in den beiden Gruppen gebildet hatten, entnommen. Die histologische Untersuchung ergab keine Unterschiede zwischen den HC11-pBABE- und den HC11-*Wnt3a*-Tumoren. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die HC11-pBABE-Tumore erst zu einem späteren Zeitpunkt erschienen und kleiner waren als die HC11-*Wnt3a*-Tumore. Während dieser Transplantationsserie wurde allerdings das wöchentliche Tumorstadium nicht protokolliert und somit kann nur die Tumorstadium nach Entnahme angegeben werden (Tabelle 4). Im Durchschnitt erreichten die HC11-pBABE-Tumore nach acht Wochen eine Größe von 0,12 cm², die HC11-*Wnt3a*-Tumore hingegen eine Größe von 0,56 cm². Die Tumorstadium wurde nach der Entnahme in zwei Dimensionen (Länge x Breite) gemessen, und die durchschnittliche Größe pro Versuchsgruppe ermittelt und graphisch dargestellt (Abbildung 22). Der p-Wert (0,032) wurde mit Hilfe des T-Tests für unabhängige Werte berechnet und zeigt an, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Tumorstadium der beiden Gruppen vorhanden ist.

Da eine immunologische Reaktion auf das Puromycin-Resistenzgen, das in dem retroviralen pBABE-Vektor enthalten ist, nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde der Versuch ein weiteres Mal mit BALB/c-nu/nu-Mäusen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Tumore wöchentlich zweidimensional gemessen (Länge und Breite der Tumore), um den Wachstumsverlauf erfassen zu können.

Dazu wurde eine Gruppe von sechs BALB/c-nu/nu-Mäusen mit HC11-*Wnt3a*-Zellen und eine Gruppe von sechs BALB/c-nu/nu-Mäusen mit HC11-pBABE-Zellen injiziert. Drei Wochen nach Injektion wurde die erste Tumorbildung beobachtet und dieser Zeitpunkt als Zeitpunkt 1 des Wachstumsverlaufs gewertet. Wie bereits bei den Injektionen in den BALB/c⁺-Mäusen beobachtet werden konnte, entwickelten beide Zelltypen subkutane Tumore. Wiederum entwickelten sich die Tumore der Kontrollgruppe (HC11-pBABE) im Vergleich zu der Testgruppe (HC11-*Wnt3a*) deutlich später. Nach weiteren 11 Wochen wurden die Mäuse geopfert und die Tumore entnommen. Drei der sechs Mäuse, die mit HC11-pBABE injiziert wurden, entwickelten Tumore von Zeitpunkt 2 an (Tabelle 5A, Maus 4, 5 und 6). Eine Maus (Tabelle 5A, Maus 2) zeigte zum Zeitpunkt 5 einen Tumor, eine weitere Maus (Tabelle 5A, Maus 3) erst zum Zeitpunkt 9. Eine weitere Maus zeigte erst bei der Entnahme zum Zeitpunkt 12 (91 Tage nach Injektion) einen Tumor (Tabelle 5A, Maus 1). Die Tumore variierten bei der Entnahme (Zeitpunkt 12) in ihrer Größe von 0,42 cm² bis 0,73 cm², womit der durchschnittliche HC11-pBABE-Tumor eine Größe von 0,52 cm² erreichte. Die mit HC11-*Wnt3a* injizierten Mäuse zeigten, bis auf Maus 6, Tumorstadium von Zeitpunkt 1 an (Tabelle 5B). Vier der sechs Mäuse wurden zum Zeitpunkt 12 geopfert (Maus 1, 3, 4 und 6), Maus 2 verstarb nach Zeitpunkt 10, Maus 5 bereits nach Zeitpunkt 3. Die durchschnittlichen Werte der einzelnen Zeitpunkte ermitteln sich somit aus der Anzahl an Mäusen, die zu dem jeweiligen Zeitpunkt noch gelebt haben. Zum Zeitpunkt 12 variierten die HC11-*Wnt3a*-Tumore zwischen 0,72 cm² und 1,95 cm² und waren somit größer als die der HC11-pBABE-Tumore. Der durchschnittliche HC11-*Wnt3a*-Tumor hatte eine Größe von 1,31 cm².

Um den Wachstumsverlauf der beiden Gruppen (HC11-pBABE und HC11-Wnt3a) ermitteln zu können, wurden die durchschnittlichen Tumorgrößen (in cm²) aller Mäuse ermittelt, die zugehörigen Standardabweichungen berechnet und in Form einer Kurve dargestellt (Abbildung 23).

Bei erster Betrachtung scheint es, als ob das Tumorwachstum der beiden Gruppen bis Zeitpunkt 9 keinen Unterschied aufweist. Erst ab Zeitpunkt 9 kann man erkennen, dass die HC11-Wnt3a-Tumore deutlich an Größe zunehmen und diese Zunahme bis Zeitpunkt 12 beibehalten. Kalkuliert man jedoch die p-Werte zu jedem Zeitpunkt der Wachstumskurve, wird deutlich, dass der Wachstumsunterschied zwischen den beiden Tumorgruppen an den jeweiligen Zeitpunkten durchaus signifikant ist. Für die Berechnung wurde der T-Test für unabhängige Werte verwendet und die p-Werte in Tabelle 6 aufgeführt. Mit Ausnahme von Zeitpunkt 2 (p-Wert = 0,069) sind alle Werte kleiner 0,05 und somit weist das Tumorwachstum zwischen den beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied auf. Infolgedessen beeinflusst *Wnt3a* das Tumorwachstum *in vivo*.

Nach der Entnahme wurden die Tumore vermessen, in Formalin fixiert und mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass beide Tumortypen die gleichen Merkmale aufwiesen, nämlich die Tendenz zur Knorpelbildung (Abbildung 24). Ansonsten wurden keine Unterschiede zwischen den HC11-pBABE- und HC11-Wnt3a-Tumoren gefunden. Die Merkmale der Tumore sind in Abbildung 24 am Beispiel eines HC11-pBABE-Tumors beschrieben. Der Tumor kann klar vom umliegenden Gewebe abgetrennt werden (Abbildung 24.A). Die Zellen innerhalb des Tumors sowie die Zellen, die den Tumor begrenzen, zeigen mesenchymale Merkmale (Abbildung 24.C und D). Zusätzlich weist der Tumor Areale mit starker Knorpelbildung auf (Abbildung 24.B). Die Knorpelbildung und die mesenchymalen Merkmale können auf eine spontane Umwandlung der ursprünglich epithelialen Zellen in mesenchymale Zellen (EMT) zurückzuführen sein.

Beide Zelllinien wurden erneut in Kultur genommen und auf mögliche Veränderungen hin analysiert. Die Zellen zeigten keine Veränderung in ihrer Morphologie, womit eine EMT *in vitro* ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich wurde mit Hilfe einer Wachstumskurve die Zellzunahme ermittelt (Abbildung 25). Die HC11-Wnt3a-Zellen wuchsen *in vitro* langsamer als die HC11-pBABE-Zellen, der Kurvenverlauf befürwortet jedoch eine Annäherung der beiden Zelllinien. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass die HC11-Wnt3a-Zellen mit 17,24 µm größer waren als die HC11-pBABE-Zellen (15,89 µm). Der Größenunterschied könnte für das langsamere Wachstum der HC11-Wnt3a-Zellen verantwortlich sein.

Tabelle 4. Tumorwachstum in BALB/c⁺-Mäusen nach Injektion mit HC11-pBABE- bzw. HC11-Wnt3a-Zellen.

<i>Maus-Nummer</i>	<i>HC11-pBABE</i> <i>(Tumorgroße in cm²)</i>	<i>HC11-Wnt3a</i> <i>(Tumorgroße in cm²)</i>
1	kt ³	1,95
2	0,6	1,54
3	kt	0,99
4	0,01	1,1
5	0,54	0,36
6	0,81	0,15
7	kt	0,3
8	0,01	1,43
9	0,09	0,01
10	0,09	kt
Ø	0,22*	0,78*

* p-Wert = 0,032

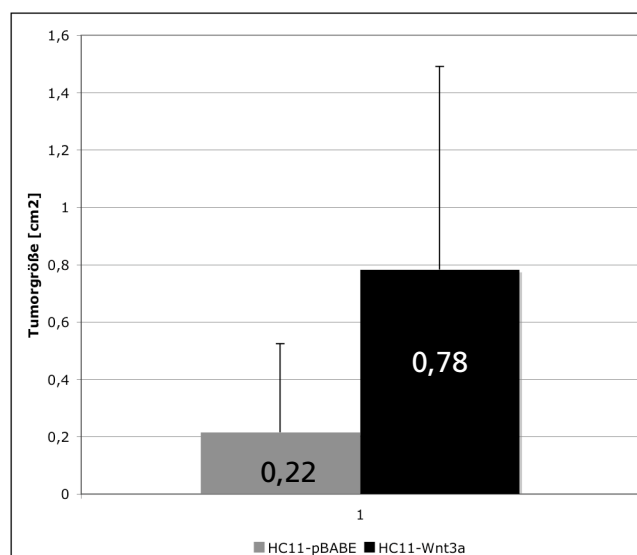


Abbildung 22. Tumorwachstum in BALB/c⁺-Mäusen. Es wurden je 10 Mäuse mit HC11-pBABE- oder HC11-Wnt3a-Zellen subkutan injiziert. Die Tumorentnahme erfolgte nach acht Wochen. Die Tumorgroße wurde nach Entnahme in zwei Dimensionen gemessen (Länge x Breite). Die durchschnittliche Tumorgroße wurde ermittelt (in cm²) und graphisch dargestellt.

³ kt = kein Tumor

Tabelle 5. HC11-pBABE- und HC11-Wnt3a-Tumorstadium in BALB/c-nu/nu-Mäusen.⁴

A. HC11-pBABE

Zeitpunkt [Wochen]	Maus 1 Tumorstadium [cm ²]	Maus 2 Tumorstadium [cm ²]	Maus 3 Tumorstadium [cm ²]	Maus 4 Tumorstadium [cm ²]	Maus 5 Tumorstadium [cm ²]	Maus 6 Tumorstadium [cm ²]
1						
2				0,2	0,05	0,23
3				0,24	0,05	0,27
4				0,26	0,05	0,16
5		0,2		0,22	0,05	0,2
6		0,2		0,22	0,05	0,2
7		0,3		0,24	0,05	0,18
8		0,27		0,36	0,05	0,18
9		0,36	0,28	0,3	0,05	0,29
10		0,36	0,35	0,36	0,18	0,29
11		0,42	0,49	0,49	0,42	0,51
12	0,56	0,42	0,53	0,53	0,42	0,73

B. HC11-Wnt3a

Zeitpunkt [Wochen]	Maus 1 Tumorstadium [cm ²]	Maus 2 Tumorstadium [cm ²]	Maus 3 Tumorstadium [cm ²]	Maus 4 Tumorstadium [cm ²]	Maus 5 Tumorstadium [cm ²]	Maus 6 Tumorstadium [cm ²]
1	0,15	0,08	0,24	0,12	0,17	
2	0,12	0,11	0,24	0,2	0,17	0,25
3	0,2	0,12	0,18	0,39	0,33	0,3
4	0,2	0,2	0,3	0,35		0,35
5	0,24	0,2	0,22	0,3		0,24
6	0,28	0,2	0,24	0,54		0,39
7	0,28	0,23	0,26	0,6		0,53
8	0,3	0,28	0,48	0,8		0,9
9	0,52	0,33	0,72	1,08		0,94
10	0,5	0,33	0,94	1,2		0,94
11	0,55		1,32	1,43		0,96
12	0,72		1,44	1,95		1,26

⁴ letzter Wert = Größe bei Tumorentnahme

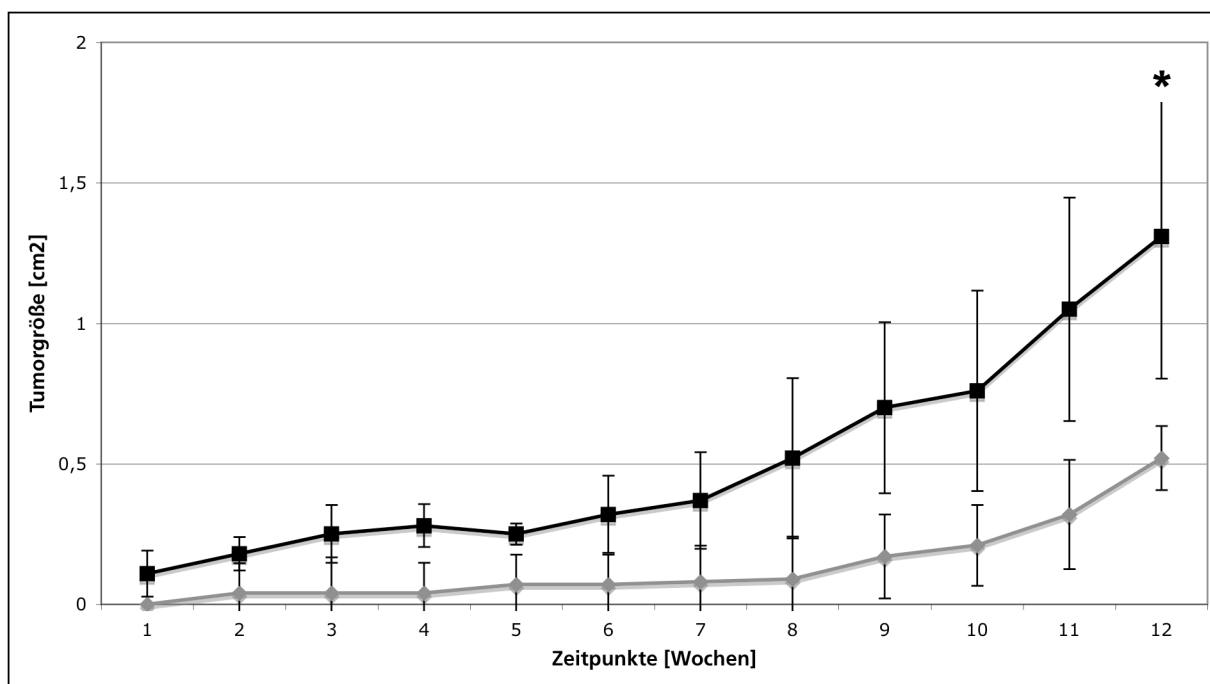


Abbildung 23. Wachstumskurve der HC11-pBABE- und HC11-Wnt3a-Tumore *in vivo*. Gemittelte Tumorgrößen und Standardabweichungen der HC11-pBABE-Tumore (grau) und HC11-Wnt3a-Tumore (schwarz), die in Tabelle 6 aufgeführt sind.

Tabelle 6. Signifikante Unterschiede im Tumorwachstum zwischen HC11-pBABE- und HC11-Wnt3a-Tumoren.⁵

Zeitpunkt	p-Wert
1	0.003543
2	0.068647
3	0.037316
4	0.006830
5	0.030687
6	0.015201
7	0.021401
8	0.013793
9	0.005748
10	0.008799
11	0.006589
12	0.004675

⁵ T-Test für unabhängige Werte

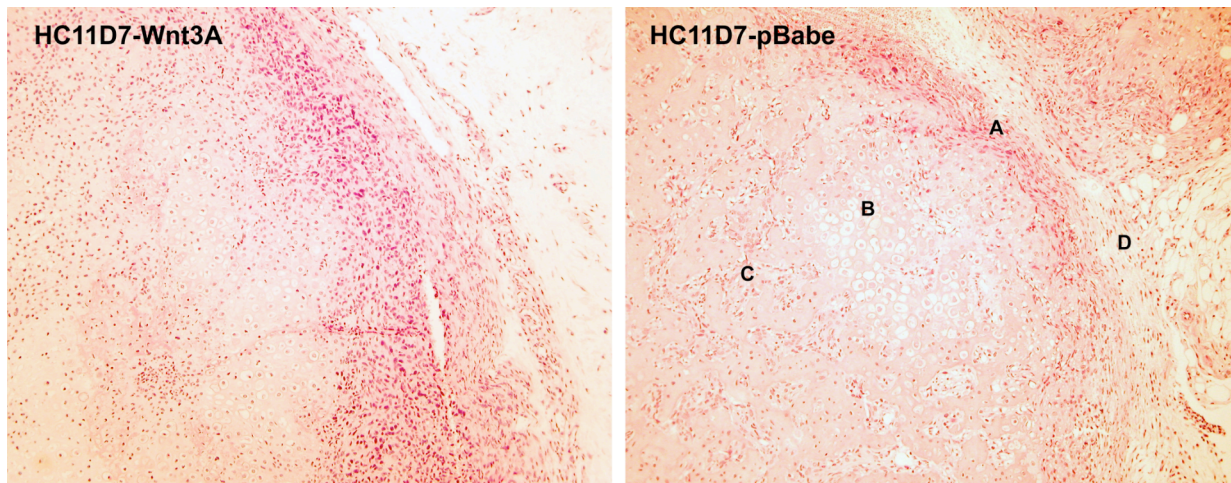


Abbildung 24. Histologie der HC11-pBabe- und HC11-Wnt3a-Tumore in BALB/c-nu/nu-Mäusen. Beide Tumortypen weisen mesenchymale Zellen anstelle von epithelialen Zellen im Tumor auf und die Tendenz der Knorpelbildung. Am Beispiel des HC11-pBabe-Tumors ist der Tumortyp beider Zelllinien beschrieben. A: Tumorrand, B: Tumoreal mit Knorpelbildung, C: stromales Gewebe innerhalb des Tumors, D: stromales Gewebe am Tumorrand.

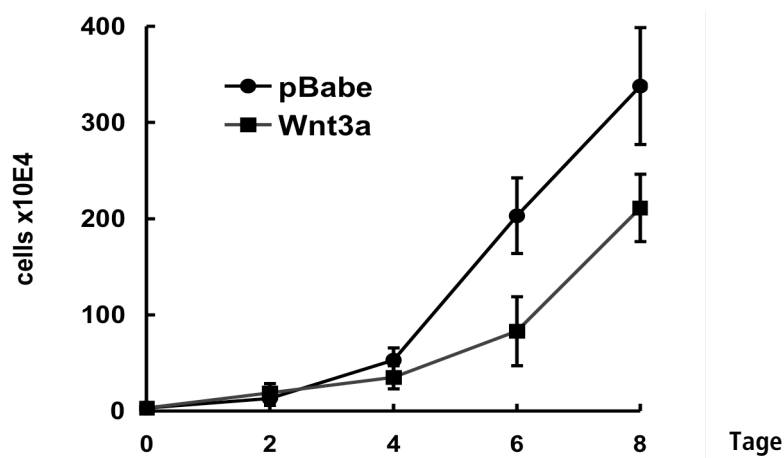


Abbildung 25. Proliferationsassay. HC11-pBabe und HC11-Wnt3a Zellwachstum *in vitro*. Die Zellzahl wurde alle zwei Tage gemessen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und die Standardabweichung der beiden Versuche ermittelt.

5. *Wnt1*-, *Wnt3*- und *Wnt3a*-Expression in MMTV-induzierten Mammatumoren

Die *Wnt*-Gene *Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt3* und *Wnt10b* sind bereits mit der Tumorigenese von Mammatumoren in Zusammenhang gebracht worden. Die Expressionsprofile von *Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt3a* und *Wnt10b* wurden durch eine RT-PCR-Analyse von 50 Mammatumoren erstellt. *Wnt1*, *Wnt3a* und *Wnt3* sind in dieser Integrationsanalyse als CIS identifiziert worden, *Wnt10b* jedoch nur als einzelne retrovirale Integrationsstelle. Somit erfüllt *Wnt10b* nicht die geforderten Merkmale eines Onkogens für die MMTV-induzierte Tumorigenese. Aus diesem Grund wurden *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a* in einer Gruppe zusammengefasst (onkogene *Wnt*-Gene), *Wnt2* und *Wnt10b* in einer weiteren. Das Ergebnis der Expressionsanalyse aller untersuchten *Wnt*-Gene ist in Tabelle 7 dargestellt. Das Vorhandensein einer Bande erwarteter Größe wurde als positive Expression gewertet. Falls zusätzliche Banden auftraten, wurden diese mit den jeweiligen *Wnt*-Oligonukleotiden sequenziert, um unspezifische von spezifischen Banden zu trennen. Betrachtet man die onkogene *Wnt*-Gruppe, ist es auffällig, dass 94% der Tumore eine positive *Wnt1*, *Wnt3* oder *Wnt3a* Expression zeigten. Insgesamt wiesen 29 verschiedene Tumore *Wnt1* Expression auf (58%), womit *Wnt1* das am häufigsten exprimierte *Wnt*-Gen ist (Abbildung 26). Am zweithäufigsten war die *Wnt3a* Expression mit 12 positiven Tumoren (24%). In 6 der 50 Tumore wurde *Wnt3* Expression nachgewiesen (12%). Tumor #7 und Tumor #98 zeigten weder Expression für eines der onkogenen *Wnt*-Gene, noch für *Wnt2* oder *Wnt10b*. Tumor #27 und Tumor #72 wiesen eine fehlende Expression für eines der onkogenen *Wnt*-Gene auf, waren jedoch positiv für eine *Wnt10b*-Expression. In den restlichen 46 Tumoren wurde jeweils nur eines der onkogenen *Wnt*-Gene exprimiert. Betrachtet man die Ergebnisse der Expressionsanalyse für *Wnt2* und *Wnt10b*, so lassen sich 24 Tumore finden, die *Wnt2* exprimieren (55%), und 23 Tumore, die eine *Wnt10b* Expression aufwiesen (48%). Gewöhnlich wurden *Wnt2* und *Wnt10b* mit einem der onkogenen *Wnt*-Gene exprimiert.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen, dass wenigstens eines der drei onkogenen *Wnt*-Gene (*Wnt1*, *Wnt3a* und *Wnt3*) in MMTV-induzierten Mammatumoren exprimiert ist. Weiterhin wurde die Expressionsanalyse mit den MMTV-Insertionen, die in der Integrationsanalyse gefunden wurden, verglichen. Von den 29 Tumoren mit einer positiven *Wnt1*-Expression konnten neun Tumore zusätzlich mit einer MMTV-Integration gekoppelt werden. Zwanzig Tumore waren *Wnt1* positiv, ohne eine Integrationsstelle im *Wnt1*-Lokus aufzuweisen. *Wnt2* und *Wnt10b* konnten in keinem Tumor mit einer MMTV-Integration gekoppelt werden. Drei der *Wnt3*-positiven Tumore wiesen auch die zugehörige MMTV-Integration auf. Keiner der *Wnt3*-negativen Tumoren zeigte eine MMTV-Integration. Im Falle der *Wnt3a*-positiven Tumore ließ sich in vier Tumoren die MMTV-Integration wiederfinden. Wiederum zeigte kein Tumor, der in der Expressionsanalyse negativ war, eine MMTV-Integration im *Wnt3a*-Genlokus auf. Mit Hilfe des Fischers Exakt-Test wurde berechnet, ob die Korrelation zwischen vorhandener Integrationsstelle und Expression signifikant ist (<http://www.matforsk.no/ola/fisher.htm>) (Tabelle 8). In allen drei Fällen lag eine signifikante Korrelation vor mit einem p-Wert von 0,006 für *Wnt1*, $p = 0,001$ für *Wnt3* bzw. $p = 0,002$ für *Wnt3a*.

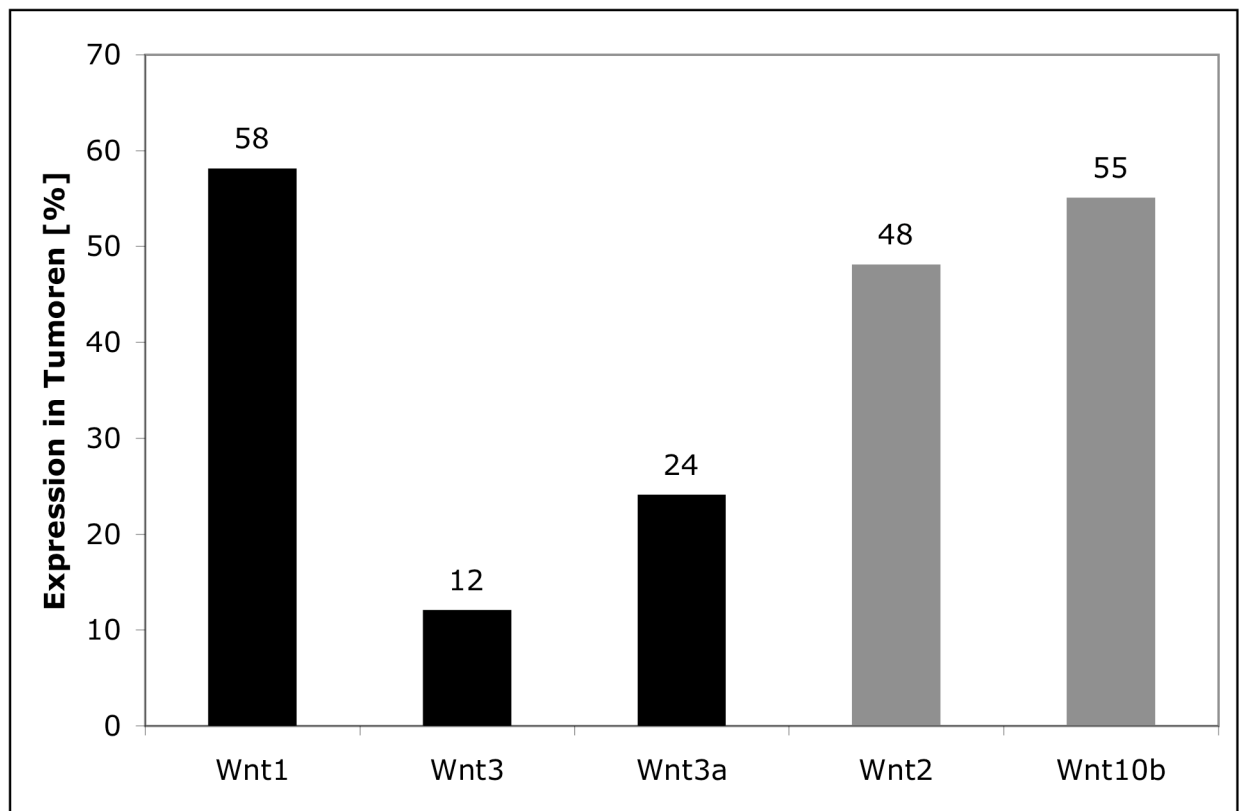


Abbildung 26. *Wnt*-Expression in BALB/c⁺-Mammatumoren. RT-PCR-Analyse von Mammatumoren. Graphische Darstellung der *Wnt*-Expression in 50 Mammatumoren. Die Zahlenwerte geben an, wieviel Prozent der Tumore das jeweilige *Wnt*-Gen exprimierten. *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a* wurden als Gruppe onkogener *Wnt*-Gene zusammengefasst, da alle drei *Wnt*-Gene als CIS in dieser Hochdurchsatzanalyse gefunden worden waren. *Wnt2* und *Wnt10b* wurden bereits mit Maus-Mammatumoren in Zusammenhang gebracht und deshalb in die Analyse mit aufgenommen.

Tabelle 7. *Wnt1*-, *Wnt2*-, *Wnt3*-, *Wnt3a*- und *Wnt10b*-Expression in BALB/c⁺-Mammatumoren.⁶

Set-Nr.	Wnt1	Wnt3	Wnt3a	Wnt2	Wnt10b
7	-	-	-	nt	-
8	-	+	-	nt	nt
10	-	+	-	nt	nt
11	+/+	-	-	+	-
14	-	-	+/+	+	-
16	+	-	-	+	-
17	-	-	+/+	-	-
20	+	-	-	+	-
21	-	+/+	-	-	-
22	-	+/+	-	+	-
24	-	-	+	+	+
25	+	-	-	-	+
27	-	-	-	nt	+
28	+	-	-	-	-
32	-	-	+	+	+
33	+	-	-	-	+
35	+/+	-	-	-	-
36	+/+	-	-	+	+
37	+	-	-	-	+
38	+/+	-	-	+	+
39	-	-	+	-	-
40	+	-	-	-	-
41	-	-	+	+	-
42	+	-	-	+	-
44	+/+	-	-	+	+
46	-	+	-	-	+
47	-	+	-	+	+
48	+/+	-	-	+	+
54	+/+	-	-	+	+
55	+/+	-	-	-	+
56	+	-	-	+	+
58	-	+/+	-	+	-
59	+	-	-	+	+
63	+/+	-	+	+	+
65	-	-	+	+	+
70	+	-	-	+	+
72	-	-	-	-	+
74	+	-	-	-	-
75	+	-	+	+	-
76	+	-	-	-	-
77	+	-	-	-	-
78	+	-	-	-	+
79	+	-	-	-	-
83	-	-	+	-	-
84	-	-	+/+	-	-
92	+	-	-	nt	+
97	+	-	-	+	-
98	-	-	-	-	-
100	+	-	-	+	-
110	-	-	+/+	nt	+

⁶ set nr = Tumor-Nummer, (+) = positive Expression, (-) = fehlende Expression, nt = nicht getestet, +/+ = MMTV-Insertion mit Splinkerette-PCR gefunden

Tabelle 8. Korrelation zwischen Wnt-Expression und MMTV-Integration.⁷

Wnt1 (p-Wert = 0,006)	Wnt-Expression +	Wnt-Expression -
MMTV-Integration +	9	0
MMTV-Integration -	20	21

Wnt3 (p-Wert = 0,001)	Wnt-Expression +	Wnt-Expression -
MMTV-Integration +	3	0
MMTV-Integration -	3	44

Wnt3a (p-Wert = 0,002)	Wnt-Expression +	Wnt-Expression -
MMTV-Integration +	4	0
MMTV-Integration -	8	38

6. WNT3a-Expression in Brustkrebs-Zelllinien und Brustkarzinomen

In den letzten Jahren wurde in einigen Studien gezeigt, dass verschiedene *WNT*-Gene in humanen Zelllinien unterschiedlichster Gewebe und Tumore exprimiert sind. Katoh zeigte 2002, dass das humane *WNT3a*-Homolog in der embryonalen Karzinom-Zelllinie NT2 und der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 exprimiert ist [71]. Es wurden allerdings keine weiteren humanen Brustkrebs-Zelllinien oder primären Mammatumore auf eine *WNT3a*-Expression hin untersucht. Um zu testen, ob weitere Brustkrebs-Zelllinien *WNT3a* exprimieren, wurden verschiedene humane Brustkrebs-Zelllinien auf eine *WNT3a*-Expression mit RT-PCR analysiert.

Für die Untersuchung wurden eine Reihe von frischen, metastasierenden Brustkarzinomzellen aus Aszites und Pleuralergüssen (genannt Macazellen) von Brustkrebs-Patientinnen, die normalen Brustzelllinien HB100 und MCF-10A, sowie die Brustkrebs-Zelllinien ZR-75.1, BT-549, MDA-MB-231, T47D, SkBr3, CAMA1 und MCF-7 verwendet. Als Positivkontrolle für die RT-PCR diente humanes Plazentagewebe. Die Positivkontrollen (Plazenta und MCF-7-Zellen) produzierten eine einzelne Bande der erwarteten Höhe (Abbildung 27). In der Tat wiesen weitere Zelllinien eine *WNT3a*-Expression auf, nämlich HB100, ZR-75.1, BT-549 und MDA-MB-231. MCF-10A, SkBr3. Die vier verschiedenen Maca-Zelllinien hingegen zeigten keine *WNT3a*-Expression (Abbildung 27). Da *WNT3a* bislang noch nicht mit humanen Brustkarzinomen in Zusammenhang gebracht worden ist, wurden 65 primäre Brustkarzinome auf eine *WNT3a*-Expression hin untersucht. Die Tumore wiesen ein hohes Epithel/Stroma-Verhältnis auf (basierend auf histologischen Untersuchungen), die mRNA von fünf normalen humanen Brustgeweben (aus Brustreduktion-Mammoplastien) wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

⁷ Fischer's Exakt Test

Als Positivkontrolle wurde erneut plazentales Gewebe verwendet. Zunächst wurden die 65 Brustkarzinome und die Kontrollen mit einer semi-quantitativen PCR analysiert (Abbildung 28). Es wurde nur ein spezifisches Produkt in der PCR gebildet, wie beispielhaft in Abbildung 28 dargestellt wurde. Die Tumornummern 17, 20, 27, 39, 40, 41, 42, 57, 63 und 65 zeigten eine *WNT3a*-Expression (15,38%). Teilweise variierte die Intensität der Banden jedoch sehr stark, so dass nicht mit vollkommener Gewissheit festgestellt werden konnte, ob alle zehn Tumore tatsächlich *WNT3a* exprimierten. Um die tatsächliche Prozentzahl der *WNT3a*-positiven Tumore zu ermitteln, wurde zusätzlich eine quantitative PCR durchgeführt. Dabei wurde in das amplifizierte PCR-Produkt SYBR Green® eingebaut, dessen fluoreszentes Signal gemessen werden kann. Als Referenzen wurden die Haushaltsgene *Beta-Aktin* und *GAPDH* verwendet. Die Menge an *WNT3a*-mRNA wurde mit der Menge an *Beta-Aktin* mRNA bzw. *GAPDH* mRNA in jeder Probe quantifiziert. Insgesamt konnten acht Tumore mit einer *WNT3a*-Expression gefunden werden, nämlich Tumornummern 17, 20, 25, 27, 41, 43, 46 und 57 (Abbildung 29). Die Tumore #17, #20, #27, #41 und #57 waren auch in der semi-quantitativen PCR positiv. Vier der ursprünglich als positiv gewerteten Tumore stellten sich in der qPCR als *WNT3a* negativ heraus (Tumornummern 39, 40, 63 und 65). Man konnte auch drei Tumore finden (Tumornummern 25, 43 und 46), die ursprünglich *WNT3a* negativ waren, in der quantitativen PCR jedoch *WNT3a* positiv wurden. Da 12% der Tumore *WNT3a* positiv blieben, deutet dies auf eine mögliche Rolle von *WNT3a* in der Entstehung einer Untergruppe von humanen Brusttumoren hin.

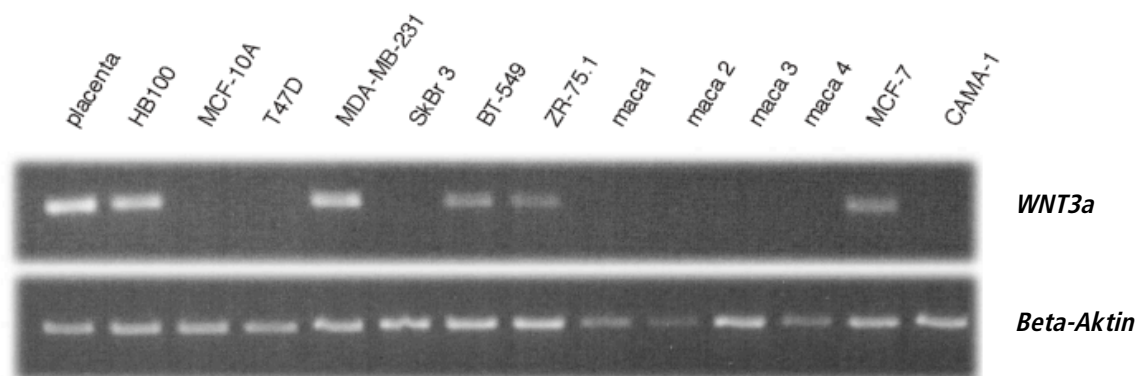


Abbildung 27. RT-PCR-Analyse auf *WNT3a*-Expression in humanen Brustkrebs-Zelllinien. Beta-Aktin = Ladekontrolle, maca= metastasierende Zellen aus Azites oder Pleuralergüssen von Brustkrebs-Patientinnen. Das Vorhandensein der spezifischen Bande wurde als positive Expression gewertet.

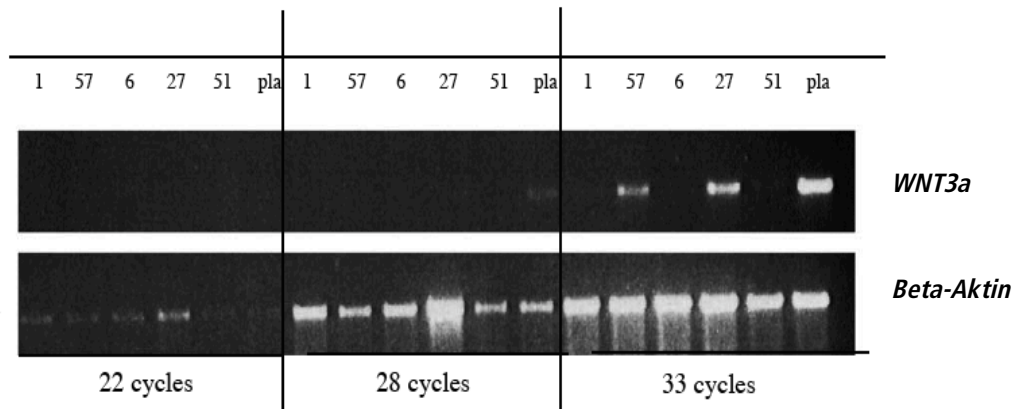


Abbildung 28. Semi-quantitative PCR. Plazenta-RNA = Positivkontrolle. Beta-Aktin = Ladekontrolle. 22, 28 und 33 Zyklen einer RT-PCR wurden auf die Bildung des spezifischen *WNT3a* PCR-Produkts hin geprüft. Die Gesamtanalyse von 65 Brusttumoren resultierte in zehn *WNT3a*-positiven Tumoren. Tumor #57 und #27 wurden beispielhaft als positive, Tumor #1, #6 und #51 als negative *WNT3a*-Tumore dargestellt.

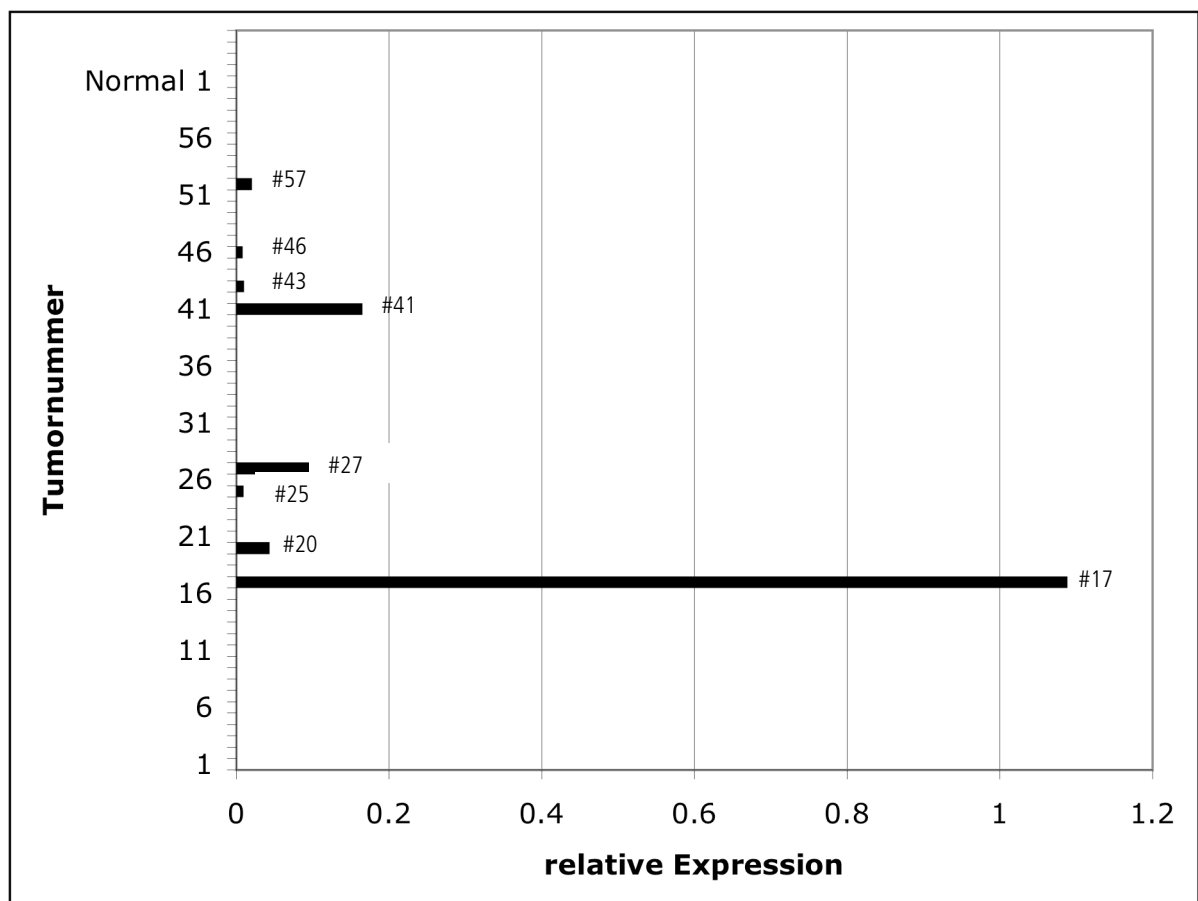


Abbildung 29. Quantitative PCR. Die mRNA von 60 Brustkarzinomen (#1-#50 und #56-#65) und 5 normalen Brustgeweben (#51-#55) (Negativkontrolle) wurde für die *WNT3a*-Expressionsanalyse eingesetzt. Ab Zyklus 30 beginnt die exponentielle Amplifikation des *WNT3a*-Produkts. Insgesamt wurden acht Tumore mit erhöhter *WNT3a*-Expression identifiziert (#17, #20, #25, #27, #41, #43, #46 und #57). Somit wird *WNT3a* in 13% der Tumore exprimiert.

Diskussion

I. Identifizierung neuer Tumorprogressionsgene

Mit der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal die Ergebnisse einer groß angelegten MMTV-Insertionsmutagenese-Studie von Maus-Mammatumoren präsentiert. Der dazu neu etablierte BALB/c⁺-Mausstamm erfüllte die geforderten Voraussetzungen einer hohen Tumorfrequenz (98%) bei kurzer Latenzzeit (durchschnittlich 266 Tage). Somit lässt sich nicht nur die Tumorinduktion, sondern die gesamte Tumorentwicklung genetisch analysieren. Der Nachweis der unterschiedlichen Intensitäten der proviralen Banden in den Mammatumoren, wie sie im Southern Blot beobachtet wurden, läßt den Schluss zu, dass die BALB/c⁺-Tumore oligoklonal vorliegen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit bereits beschriebenen Resultaten in GR-Mäusen [95, 96]. Weiterhin bestätigten die Southern Blot Analysen, dass im Vergleich zum BALB/c-Wildtyp in den BALB/c⁺-Mammatumoren zusätzliche MMTV-Integrationen vorlagen. Dadurch wurde die Tumorigenese beschleunigt und auch die Bildung von Metastasen begünstigt. Mit der s.c. Injektion der zerkleinerten Lungen aus den BALB/c⁺-Mäusen, die einen Mammatumor entwickelten, konnten gestreute Tumorzellen im Lungengewebe zu weiterem Wachstum subkutan angeregt werden. Dadurch erhielt man ausreichend Tumormaterial für genetische Analysen.

Durch die Untersuchung von 60 MMTV-induzierten Mammatumoren auf MMTV-Insertionen, konnten neun Integrationsstellen identifiziert werden, die in mindestens zwei verschiedenen Tumoren vorlagen (*Wnt1*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Fgf3*, *Edg5*, *Slc25a10*, *Ramp1*, *KV2B_Mouse* und *Trnt1*) (Tabelle 3). Eine solche Integrationsstelle bzw. das von der MMTV-Integration betroffene Gen bezeichnet man als CIS (Common Integration Site). Trifft man eine MMTV-Integration an einem bestimmten Genlokus in nur einem Tumor an, so bezeichnet man diese als RIS (Retroviral Integration Site). Die Deregulierung eines Gens, welches von einer MMTV-Integrationsstelle flankiert wird, kann über Promotor- oder Verstärkerelemente im Virus verursacht werden. Allerdings können gerade retrovirale Verstärkerelemente über eine sehr lange Distanz agieren, so dass mit der durchgeführten Untersuchung weitere CIS unter Umständen nicht erfasst worden sein könnten [97-99]. Zu den in dieser Arbeit identifizierten neun CIS konnten zusätzlich 80 RIS identifiziert werden (Tabelle 2). In Tabelle 9 sind jene Gene aufgeführt, die durch eine MMTV-Integration flankiert waren und eine mögliche Funktion in der Tumorentstehung besitzen. Von diesen wurden 19 Gene (21%) in Mammatumoren nachgewiesen, 16 Gene (18%) wurden mit anderen Tumoren, u.a. Leukämien und Sarkome, in Verbindung gebracht.

Tabelle 9. Flankierende Gene in CIS und RIS mit bekannter Funktion in der Tumorigenese.

Gene mit bekannter Funktion bei Mammatumoren (CIS sind fett gedruckt)		
Name	Funktion	Referenz
Wnt1	Transgene <i>Wnt1</i> -Expression führt in der murinen Mamma zu lobuloalveolaren Hyperplasien	[47]
Wnt3	<i>WNT3</i> wurde in primären Brusttumoren nachgewiesen	[100]
Wnt3a	<i>WNT3a</i> transformiert C57MG-Zellen <i>in vitro</i>	[91]
<i>Fgfr1</i>	Eine dauerhafte <i>FGFR1</i> -Aktivierung führt zu Hyperplasien und invasiven Läsionen	[101]
Fgf3	<i>FGF3</i> -Amplifikation korreliert mit der Überlebensrate in Brustkrebspatientinnen	[102]
<i>Fgf4</i>	<i>FGF4</i> -Expression kann metastasierende Mammatumore induzieren	[103]
<i>Fgf8</i>	<i>FGF8</i> ist in einigen Brusttumoren erhöht exprimiert	[104]
<i>Itgb4</i>	<i>Beta4-Integrin</i> ist an der Progression von ErbB2-induzierten Mammatumoren beteiligt	[105]
<i>Tk2</i>	<i>TK1</i> und <i>TK2</i> sind Prognosemarker beim Mammakarzinom	[106]
<i>Tnc</i>	<i>Tenascin-C</i> beeinträchtigt die genomische Stabilität	[107]
<i>Esr1</i>	Ein <i>Esr1</i> -Geno- und Haplotyp ist mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert	[108]
<i>Rab2</i>	<i>Rab2</i> ist ein <i>ErbB4</i> -Zielgen und ist ein potentieller Marker für das Mammakarzinom	[109]
<i>Rbm9</i>	<i>Rbm9</i> Splice-Varianten werden in MCF7 und MBA-MD-231 Zellen nachgewiesen	[110]
<i>Ugt1a1</i>	<i>Ugt1a1</i> ist ein potentieller Marker für das Mammakarzinom	[111]
<i>Tlr9</i>	TLR9 ist an der Tumorprogression beteiligt und eine mögliche Zielstruktur für neue Therapieansätze	[112]
<i>Abca4</i>	<i>Abca4</i> erhöht die Medikamentenresistenz <i>in vitro</i>	[113]
<i>Kit</i>	<i>cKit</i> ist ein potentieller Marker für das Mammakarzinom	[114]
<i>Ppp2r2b</i>	<i>Ppp2r2b</i> ist möglicherweise ein Tumorsuppressorgen	[115]
<i>Prdm5</i>	<i>Prdm5</i> ist möglicherweise ein Tumorsuppressorgen	[116]

Gene mit bekannter Funktion in der Tumorigenese		
Name	Funktion	Referenz
<i>Edg5</i>	<i>EDG5</i> könnte an der Regulierung der Metastasierung in Melanomen beteiligt sein	[117]
<i>Ramp1</i>	<i>RAMP1</i> wird in Hyperplasien und Karzinomen der Prostata exprimiert	[118]
<i>Fzd10</i>	<i>FZD10</i> wird in Synovialsarkomen überexprimiert und könnte eine neue Zielstruktur zu deren Therapie darstellen	[119]
<i>Ifnar2</i>	<i>IFNAR2</i> wird in Knochenmarkszellen von CML Patienten überexprimiert	[120]
<i>Chst11</i>	<i>CHST11</i> -Deregulation wurde in einer B-CLL beobachtet	[121]
<i>Cop9</i>	COP9 liegt in einem Signalweg, der an der Entwicklung von Leukämien beteiligt sein könnte	[122]
<i>Trim32</i>	TRIM32 besitzt einen anti-apoptotischen Effekt in Hauttumoren	[123]
<i>Gria2</i>	<i>GRIA2</i> wird in SCLC-Zellen exprimiert	[124]
<i>Ncam2</i>	<i>NCAM2</i> ist ein potentieller Marker für das Prostatakarzinom	[125]
<i>Tmpo</i>	<i>Tmpo</i> ist im Medulloblastom der Maus hoch reguliert	[126]
<i>Spock2</i>	<i>Testican2</i> ist u.U. an der Invasivität von Gliomazellen beteiligt	[127]
<i>Rab3c</i>	<i>RAB3c</i> ist in einigen Kolonkarzinomen hoch reguliert	[128]
<i>Hhip</i>	<i>Hhip</i> begünstigt möglicherweise die Tumorangiogenese	[129]
<i>Odz1</i>	<i>ODZ1</i> wird von papillären Thyroidkarzinomen überexprimiert	[130]
<i>Idb4</i>	<i>IDB4</i> ist ein potentieller Tumorsuppressor in Leukämien	[131]

Da einmalige Insertionen zufälliger Natur sein können und somit als nicht relevant für die Onkogenese eingestuft wurden, fokussierten sich Insertionsmutagenese-Studien bislang lediglich auf Gene, die in CIS gefunden wurden. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich wird, stellen jedoch auch jene Gene, die in RIS gefunden wurden, potentielle Kandidaten dar, die an der Progression von MMTV-induzierten Mammatumoren beteiligt sein könnten.

II. Die Rolle von *Wnt3a* in der Tumorigenese von Mammatumoren

1. Aktivierung von *Wnt3a* durch MMTV

Die Analyse der MMTV-Insertionsstellen in Maus-Mammatumoren identifizierte *Wnt3a* als neue CIS. Damit stellt *Wnt3a* ein potentielles Onkogen dar. Neben *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt10b* ist *Wnt3a* das vierte *Wnt*-Gen, welches als CIS in Mammatumoren nachgewiesen wurde [23, 42, 43]. Sechs der MMTV-induzierten Mammatumore wiesen eine MMTV-Integration in der Nähe des *Wnt3a*-Genlokus auf. Zunächst wurde mittels RT-PCR untersucht, ob MMTV zur Transkription von *Wnt3a* führte. Für diese Analyse konnten jedoch nur fünf der sechs Tumore herangezogen werden, da nur von diesen noch ausreichend Tumormaterial zur Isolierung von RNA vorhanden war. Die Oligonukleotide waren dabei so gewählt, dass eine Amplifikation der genomischen DNA ausgeschlossen werden konnte. Eine *Wnt3a*-Expression wurde bisher weder in jungfräulichen noch in laktierenden Drüsen der Mamma gefunden [132, 133]. So dass der Nachweis von *Wnt3a*-Transkripten auf eine Aktivierung durch MMTV hindeutet. In vier der fünf überprüften Tumore lag eine *Wnt3a*-Expression vor. Obwohl MMTV in Tumor #110 in Intron 1 des *Wnt3a*-Gens inserierte (Abbildung 14), konnte das gesuchte Transkript nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die für das Protein kodierende Sequenz (cds) und der gewählte Amplifikationsbereich beide in Exon 4 liegen. Weiterführende Untersuchungen werden zeigen, ob neben dem Transkript auch das Protein exprimiert wird.

Weiterhin wurde durch RT-PCR-Analyse geklärt, ob die MMTV-Integration im *Wnt3a*-Genlokus mit der *Wnt3a*-Expression korrelierte. Hierzu wurde die Analyse auf 50 willkürlich ausgewählte MMTV-induzierte Mammatumore ausgeweitet. Insgesamt zeigten 12 Mammatumore eine *Wnt3a*-Expression (24%), von denen vier Tumore gleichzeitig eine MMTV-Integration im *Wnt3a*-Genlokus aufwiesen. Somit ergibt sich eine signifikante Korrelation (p-Wert = 0,002), die vermuten lässt, dass auch die restlichen acht Mammatumoren, in denen eine *Wnt3a*-Expression vorlag, durch MMTV aktiviert wurden.

2. Expressionsanalyse von *Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt3a* und *Wnt10b* in Maus-Mammatumoren

Da neben *Wnt3a* auch *Wnt1* und *Wnt3* mit der Splinkerette-PCR als CIS identifiziert wurden, führte man auch für diese beiden Gene eine Expressionsanalyse durch und untersuchte die Korrelation zwischen Expression und MMTV-Integration untersucht. Dafür wurden wiederum die 50 MMTV-induzierten Mammatumore verwendet, mit denen auch die *Wnt3a*-Expressionsanalyse durchgeführt worden war. Die Analyse ergab, dass 58% der untersuchten Mammatumore *Wnt1* und 12% der Tumore *Wnt3* exprimierten. Betrachtet man die Korrelation zwischen Expression und MMTV-Integration, zeigt sich eine Signifikanz sowohl für *Wnt1* (p-Wert = 0,006) als auch für *Wnt3* (p-Wert = 0,001). Da weder *Wnt1* noch *Wnt3* oder *Wnt3a* in jungfräulichen oder laktierenden Brustdrüsen exprimiert werden [133-135], jedoch regelmäßig in MMTV-induzierten Mammatumoren, liegt die Vermutung nahe, dass *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a* eine Gruppe von *Wnt*-Genen mit onkogenem Potential bildet. Darüber hinaus stellt sich die Frage nach der Redundanz des Systems „*Wnt*“.

Für die Beantwortung der Frage wurden weitere *Wnt*-Gene, die möglicherweise eine Rolle in der Tumorigenese der Mamma spielen, auf ihre Expression in den 50 zufällig ausgewählten MMTV-induzierten Mammatumoren untersucht. Zwei weitere *Wnt*-Gene mit onkogenem Potential sind *Wnt2* und *Wnt10b*, da auch diese beiden Gene C57MG-Zellen *in vitro* transformieren können [91] und eine redundante Funktion bezüglich ihres onkogenen Potentials bereits vorgeschlagen wurde [45]. Obwohl eine *Wnt10b*-Expression in 46% der Tumore vorlag, konnte die Expression in keinem Fall mit einer korrespondierenden Insertion gekoppelt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die bereits vorhandene *Wnt10b*-Expression in der Mausmamma [136]. Es wäre ebenfalls denkbar, dass *Wnt10b* über einen anderen Mechanismus als die MMTV-induzierte Mutagenese aktiviert wird. Vierundzwanzig Tumore waren positiv für *Wnt2* (48%), doch auch hier konnte keine MMTV-Integration im *Wnt2*-Genlocus nachgewiesen werden. Da auch *Wnt2* bereits während der Entwicklung der Mamma exprimiert wird, ist es möglich, dass die Expression von *Wnt2* und *Wnt10b* auf einen anderen Mechanismus zurückzuführen sind als der Aktivierung durch eine MMTV-Integration.

Die Expressionsanalyse der *Wnt*-Gene mit onkogenem Potential (*Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a*), zeigte, dass in 92% der 50 untersuchten Mammatumoren eine Genexpression vorliegt. Da insbesondere diese drei *Wnt*-Gene den Wnt/Beta-Catenin-Signalweg aktivieren können [137, 138], liegt die Annahme nahe, dass diese drei *Wnt*-Gene den Wnt/Beta-Catenin-Signalweg aktiviert haben. Außerdem können *Wnt1* und *Wnt3a* jeweils die Funktion des verwandten Moleküls übernehmen [139], sie zeigen also eine Redundanz. Die Expression von zwei *Wnt*-Genen in einem Tumor müsste demnach nicht notwendigerweise einen additiven Effekt auf die Tumorigenese haben. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten zusätzliche Signalwegsanalysen durchgeführt werden. Des weiteren müsste die Redundanz der untersuchten *Wnt*-Gene *Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt3a* und *Wnt10b* in einem geeigneten System ausführlicher analysiert werden. Durch die hohe Anzahl an *Wnt*-exprimierenden Tumoren (92%) erscheint eine zufällige Beteiligung der *Wnt*-Genfamilie an der Tumorentstehung und -progression des Mammarkarzinoms jedoch unwahrscheinlich.

3. *Wnt3a* ist ein potentiell Onkogen

Eine Klassifizierung der *Wnt*-Gene aufgrund ihres Potentials, C57MG-Epithelzellen *in vitro* zu transformieren, erfolgte bereits 1994 [90]. Hierbei wurden die *Wnt*-Gene in zwei Klassen eingeteilt: die Wnt1-Klasse beinhaltet jene *Wnt*-Gene, die Zellen transformieren können (*Wnt1*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt7a*, *XWnt8*, *XWnt8b*), der Wnt5a-Klasse gehören demgegenüber die *Wnt*-Gene an, die diese Fähigkeit nicht aufweisen (*Wnt5a*, *Wnt4*, *Wnt5b*, *Wnt7b*, *XWnt11*) [91, 140, 141]. Die Fähigkeit eines Gens, Zellen zu transformieren, weist auf ein onkogenes Potential hin und definiert die *Wnt*-Gene der Wnt1-Klasse als potentielle Onkogene. Bemerkenswerterweise sind die Gene der Wnt1-Klasse auch diejenigen *Wnt*-Gene, die den Wnt/Beta-Catenin-Signalweg aktivieren können. Möglicherweise besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Stabilisierung von zytoplasmatischen BETA-CATENIN und der Tumorigenese epithelialer Zellen [91].

Es lässt sich also die Hypothese aufstellen, dass die Aktivierung von *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a* durch MMTV-Integration zur Stabilisierung von zytoplasmatischen BETA-CATENIN führt und die betroffene Zelle transformiert wird. Für *Wnt1* und *Wnt3* wurde bereits gezeigt, dass ihre Überexpression Tumore *in vivo* auslösen kann [45], eine Studie zu *Wnt3a* steht noch aus. Die Ergebnisse einiger Studien weisen jedoch auf das onkogene Potential von *Wnt3a* hin [91, 142, 143].

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Untersuchung von Shibamoto et al. [144], welche die mögliche Beteiligung von *Wnt3a* an der Reorganisation des Zytoskeletts beschreibt. Die Reorganisation könnte entweder durch TCF/LEF-Zielgene oder direkt durch Komponenten der *Wnt3a*-Signalkaskade ausgelöst worden sein. Als weitere Möglichkeit wird eine Beteiligung von Villin an der Reorganisation diskutiert. Die Funktion von Villin wird über intrazelluläres Ca^{2+} reguliert. Ein Umstand, der ein weiteres Model zulässt: Wnt-Signale könnten die Villin-Aktivität direkt regulieren, indem sie die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen verändern. Dies würde zu einer veränderten Struktur der Aktin-Mikrofilamente führen und somit die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen. Es liegen jedoch keine weiteren Studien vor, in denen eine Beteiligung von *Wnt3a* am Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg beschrieben wird. Somit ist eine Beteiligung von *Wnt3a* außerhalb des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs noch zweifelhaft.

Das Zytoskelett wird u.a. auch während der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) umgestaltet und ermöglicht die Invasion. Die EMT ist eine Voraussetzung dafür, dass Zellen den epithelialen Verband verlassen und das umliegende Stroma durchwandern. Die Disseminierung einzelner Tumorzellen wird dadurch eingeleitet und hat eine systematische Aubreitung zur Folge. Die EMT geht mit einer verminderten Expression epithelialer Marker (z.B. E-Cadherin) und erhöhten Expression mesenchymaler Marker (z.B. N-Cadherin, smooth muscle actin) einher [145]. Die dabei veränderte Expression von E-Cadherin und N-Cadherin könnte durch eine veränderte Wnt-Aktivität zustande kommen. Obwohl die alleinige Überexpression von *Wnt3a* in Zellen des Neuralrohrs keine EMT auslösen kann [146], besteht die Möglichkeit, dass in epithelialen Zellen der Mamma *Wnt3a* alleine oder im Zusammenspiel mit weiteren Komponenten die EMT beeinflusst.

Eine weitere Funktion von *Wnt3a* wurde 2003 von Reya et al. beschrieben, wonach *Wnt3a* an der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist [147]. Auch in Stammzellen aus Brustdrüsengewebe wurde die Beteiligung des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs nachgewiesen. Hier ist der Signalweg entscheidend für das Überleben der Stammzellen durch ihre Interaktion mit E-Cadherin [148]. Diese Funktion von *Wnt3a* wirft ein neues Licht auf die Rolle der *Wnt*-Gene innerhalb der Tumorentstehung. Diese Beobachtung bestärkt die Hypothese, dass die Zelle, die schließlich zur Tumorzelle entartet, entweder einer multipotenten Stammzelle oder einer Vorläuferzelle des jeweiligen Gewebes entspricht oder aber sie stellt eine ausdifferenzierte Zelle dar, die aufgrund von Mutationen wieder Stammzellcharakter annimmt [149]. Zu den Signalwegen, die für die Erhaltung bzw. die Selbsterneuerung von Stammzellen verantwortlich sind, gehören neben dem Wnt/Beta-Catenin-Signalweg auch der Notch-, der Fgf- und Hedgehog-Signalweg [150-153]. Eine Interaktion zwischen dem Fgf- und Wnt-Signalweg ist mehrfach beobachtet worden [154-157], wobei jedoch funktionelle Analysen, die zeigen, welche *Wnt*-Gene mit welchen *Fgf*-Genen interagieren können noch ausstehen.

In einer *in vivo*-Untersuchung haben Theodorou et al. beobachtet, dass sich in der Maus nach s.c. Injektion von *Wnt1*- und *Fgf10*-transformierten Brustepithelzellen metastasierende Mammatumore bildeten [34]. Falls tatsächlich eine Redundanz zwischen den onkogenen *Wnt*-Genen *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a* besteht, sollten auch *Wnt3* und *Wnt3a* zusammen mit dem entsprechenden *Fgf*-Gen metastasierende Tumore auslösen können. Da hierzu noch keine dementsprechenden Studien vorliegen, ist diese Annahme spekulativ.

Um die Stammzelle in ihrer Funktion zu erhalten scheint ein komplexes Zusammenspiel der einzelnen Signalwege aber nötig zu sein, da der Wnt/Beta-Catenin-Signalweg allein für die Aufrechterhaltung von humanen embryonalen Stammzellen nicht ausreicht [143]. Es sind also genau diejenigen Signalwege, die auch während der Embryonalentwicklung eine essentielle Funktion einnehmen und in der Stammzellentwicklung und -erhaltung entscheidend sind. Es ist daher nicht überraschend, dass auch in MMTV-induzierten Mammatumoren viele *Wnt*-Gene exprimiert vorliegen, die den Wnt/Beta-Catenin-Signalweg aktivieren können (*Wnt1* und *Wnt3a*). Von zahlreichen Arbeitsgruppen wurde vorgeschlagen, dass eine MMTV-Insertion in der Nähe eines onkogenen *Wnt*-Gens und die daraus resultierende Aktivierung einen Vorteil für die Transition der Zelle in eine Tumorzelle darstellt [158].

An der Entwicklung der Mamma sind verschiedene *Wnt*-Gene beteiligt (*Wnt2*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt6*, *Wnt7b* und *Wnt10b*) [135, 159], jedoch liegt im adulten Gewebe keine *Wnt1*-, *Wnt3*- oder *Wnt3a*-Expression vor [132, 133]. Die Expression von *Wnt3a* führt in C57MG-Zellen zur Transformation [91], ein Ereignis, das auch in HC11-Zellen beobachtet werden konnte. Der onkogene Effekt von *Wnt3a* wurde bisher aber noch nicht *in vivo* gezeigt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Onkogenität von *Wnt3a* *in vivo* nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde die *Wnt3a*-cDNA in eine epitheliale Zelllinie (HC11) transduziert, die ein schwach tumorigenes Potential aufweist. Zum ersten Mal wurde die Bildung von Kolonien durch transduzierte HC11-Wnt3a-Zellen nachgewiesen, eine Fähigkeit, zu der nur transformierte Zellen in der Lage sind, da normale Epithelzellen nur adhärent wachsen können. Da das Wachstum von transformierten Zellen in Soft Agar häufig mit deren Tumorigenität korreliert, könnte das nicht-adhärente Wachstum einen frühen Schritt in der Bildung eines malignen Phänotyps widerspiegeln [160]. Zusätzlich konnte durch die Transplantation der HC11-Wnt3a-Zellen in BALB/c-nu/nu-Mäuse eine wachstumsfördernde Eigenschaft von *Wnt3a* gezeigt werden. Obwohl die ursprünglichen HC11-Zellen nach einer langen Latenzzeit Tumore entwickelten, zeigte das deutlich schnellere Wachstum der HC11-Wnt3a Tumore, dass eine *Wnt3a*-Überexpression *in vivo* die Tumorentwicklung begünstigt. Das hier verwendete System ist ein anerkanntes System zur Überprüfung von potentiellen Onkogenen durch Transduktion der Kandidatengene in HC11-Zellen, welches bereits für die Validierung von *Fgf10* [34], von verschiedenen *Wnt*-Genen [92] und von *ErbB2* [94] verwendet wurde. Die HC11-pBABE und HC11-Wnt3a-Tumore zeigten dieselben histologischen Merkmale, nämlich eine Transition der epithelialen zu mesenchymalen Zellen sowie eine Tendenz zur Knorpelbildung. Die wachstumsfördernde Komponente von *Wnt3a* konnte jedoch noch ausreichend demonstriert werden, um von *Wnt3a* als Onkogen zu sprechen. Die Wiederholung der dargestellten Versuchsreihe unter Verwendung verschiedener Mammaepithelzelllinien könnte hier ein zielführender Ansatz sein.

4. Die Funktion von *WNT3a* in einer Untergruppe humaner Brustkarzinome

Seit der Entdeckung der *Wnt*-Gene in Mammatumoren von Inzucht-Mausstämmen ist man an der Funktion von *WNT*-Genen in humanen Brusttumoren interessiert. Seit der Klonierung des humanen *WNT1*-Homologs, wurden Brusttumore auch auf eine *WNT1*-Expression hin untersucht [45]. Bislang weisen die Resultate allerdings darauf hin, dass *WNT1*, im Gegensatz zu Maus-Mammatumoren, keine zentrale Funktion in humanen Brusttumoren zukommt [161].

Man sollte jedoch bedenken, dass es insgesamt 19 Mitglieder in der Familie der *WNT*-Gene gibt und auch zwischen den humanen *WNT*-Genen möglicherweise Redundanzen auftreten können. In der humanen Situation könnte somit durchaus eine *WNT*-Aktivierung vorliegen, nur dass in der humanen Situation andere Mitglieder der Genfamilie für die Tumorigenese verantwortlich sind als in der Maus. Obwohl zu allen 19 *WNT*-Genen noch keine systematischen Studien vorliegen, haben einzelne Untersuchungen gezeigt, dass *WNT2*, *WNT4*, *WNT5a*, *WNT7b*, *WNT10b* und *WNT13* in Brusttumoren exprimiert werden [133, 162-165]. Die Beobachtung, dass *WNT3a* ebenfalls in einem Teil der untersuchten Brusttumore exprimiert wird, zeigt wiederum, dass die Analyse eines einzelnen *WNT*-Gens womöglich nicht ausreicht, um ein vollständiges Bild zur Funktion der *WNT*-Gene in Brusttumoren zu erlangen. Da in den bisherigen Untersuchungen nicht immer die Expression aller 19 *WNT*-Gene analysiert wurde, kann keine zuverlässige Aussage über eine mögliche Korrelation zwischen *WNT*-Genexpression und klinischen Parametern gemacht werden. Untersuchungen sollten sich aber nicht auf die *WNT*-Genexpression allein beschränken, sondern die Beteiligung der *Wnt*-Signalwege an der Brustkarzinogenese insgesamt genauer betrachten. Da *WNT*-Gene verschiedene Signalwege aktivieren können, sollten all diese auch in Brusttumoren genauer untersucht werden. So wird bislang die Korrelation zwischen der Expression von *BETA-CATENIN*, der zentralen Komponente des *Wnt*/Beta-Catenin-Signalwegs, und klinischen Parametern noch kontrovers diskutiert [78, 166].

Vielfach wurde postuliert, dass die Studien zur *Wnt*-Expression in der Maus nicht ohne Probleme auf den Menschen übertragen werden können, da *WNT1* in Brusttumoren keine homologe Funktion zu *Wnt1* in murinen Mammatumoren aufzuweisen scheint. Dennoch wurde auch in der humanen Brust eine Funktion der *WNT*-Gene nachgewiesen, was auf eine Beteiligung an der Brustkarzinogenese hindeuten könnte. Normalerweise liegt in den Brustdrüsen eine *WNT2*-Expression in den Stromazellen vor, in Brustkarzinomen hingegen wurde zusätzlich eine Expression des Gens in epithelialen Zellen beobachtet [164]. Dabei geht mit der *WNT2*-Expression ein Wechsel von parakriner zu autokriner Versorgung mit Wachstumssignalen einher. Diese Beobachtung zeigt, dass der Einfluss der *WNT*-Gene in humanen Brusttumoren womöglich komplexer ist, als in MMTV-induzierten Mammatumoren. Neben den beschriebenen Unterschieden hinsichtlich der Genexpression und der Aktivierung von Signalwegen liegen zwischen Maus und Mensch doch viele Übereinstimmungen in der Tumorigenese des Mammakarzinomas vor. Etablierte Mausmodelle tragen somit durchaus zur Identifikation von humanen Onkogenen bei und bleiben deshalb in der Aufklärung der Onkogenese weiterhin unabkömmlich.

Zusammenfassung

Jede achte Frau in westlichen Industrienationen erkrankt an Brustkrebs, wobei die Entwicklung neuer Methoden zur frühzeitigen Erkennung von Metastasen und ihrer zielgerichteten Behandlung entscheidend sind, um das Überleben von Patientinnen mit progressivem Mammakarzinom zu verbessern. Transformiert eine Epithelzelle in der Brust zu einer Tumorzelle, so ist für diese Veränderung des Phänotyps eine veränderte Expression zahlreicher Gene zu erwarten. Deshalb ist die Identifizierung von Genen, die an der Tumorigenese eines Brusttumors beteiligt sind, von großer Bedeutung. In einem Modellsystem für die Progression des Mammakarzinoms wurde 1982 die erste Integrationsstelle identifiziert, die mit der Ausbildung eines Mammatumors in der Maus korrelierte. Es zeigte sich, dass das flankierende Gen *Wnt1* und der Signalweg, der von dieser Integration dereguliert wird (Wnt/Beta-Catenin Signalweg), einer der entscheidenden Faktoren in der Entwicklung von Mammatumoren in der Maus ist. Bis heute konnten in Maus-Mammatumoren 14 Gene gefunden werden, die durch retrovirale Insertionsmutagenese dereguliert worden waren. Diese Gene fallen u.a. in die Genfamilie der *Wnt*- und *Fgf*-Gene, die sowohl in der Maus als auch im Menschen mit der Entstehung von Mammatumoren in Verbindung gebracht werden konnten. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer MMTV-Integrationsstellen und der flankierende Gene, die als potentielle Tumorprogressionsgene für die Veränderungen in der Zelle hin zu einem invasiven Phänotyp verantwortlich sein könnten. In der hier vorgestellten Studie wurden Maus-Mammatumore mit einer neu etablierten Hochdurchsatzanalyse, der Splinkerette-PCR, untersucht. Die Induktion der Mammatumore erfolgte in BALB/c-Mäusen, die mit MMTV-C3H infiziert worden waren (BALB/c⁺). In diesem System identifizierte Gene könnten ebenfalls relevant für humane Brusttumore sein und deren Genexpression gegebenenfalls als prognostische Marker bei der Früherkennung von Brusttumoren dienen.

Insgesamt wurden 60 Mammatumore analysiert und 594 auswertbare Sequenzen bzw. 89 Gene gefunden. Wird eine MMTV-Integration und der dadurch betroffene Genloкус in nur einem Tumor gefunden, wird diese Integrationsstelle als RIS bezeichnet (Retroviral Integration Site). Insgesamt 80 solcher RIS wurden in dieser Arbeit identifiziert. Wird eine MMTV-Integration und der flankierende Genloкус hingegen in mindestens zwei verschiedenen Tumoren gefunden, handelt es sich um eine CIS (Common Integration Site). Dieser Integrationsmodus wurde für neun Gene nachgewiesen. Eines dieser neun Gene, das noch nicht als potentielles Onkogen bekannt war, ist *Wnt3a*. Die Aktivierung von *Wnt3a* durch MMTV in fünf Mammatumoren, die eine Integrationsstelle in der Nähe des *Wnt3a*-Genloкус aufwiesen, konnte mit RT-PCR bestätigt werden. Somit wurde *Wnt3a* in diesen Tumoren hoch reguliert, was zur Aktivierung des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs geführt haben könnte. Eine solche Aktivierung kann auch durch *Wnt1* und *Wnt3* ausgelöst werden, beides Gene, die bereits als Onkogene in Mammatumoren beschrieben wurden. Um eine mögliche Co-Expression mit *Wnt1* und *Wnt3* auszuschließen, wurde die RT-PCR-Analyse auf 50 zufällig ausgewählte Mammatumore ausgeweitet. Die Analyse zeigte, dass alle 50 Tumore jeweils nur eines dieser *Wnt*-Gene exprimierten. Zwischen *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a* kam es somit zu keiner Co-Expression.

Aufgrund dieser Resultate konnten *Wnt1*, *Wnt3* und *Wnt3a* in einer Gruppe zusammengefasst werden, die als onkogene Wnt-Gene bezeichnet wurde. Zusätzlich zu den onkogenen *Wnt*-Genen wurde die Expressionsrate von *Wnt2* und *Wnt10b* ermittelt, da auch diese beiden *Wnt*-Gene bereits mit der Induktion von Mammatumoren in Zusammenhang gebracht wurden. Da *Wnt2* und *Wnt10b* in dieser Arbeit nicht als MMTV-Zielgen identifiziert worden waren, wurden sie nicht der Gruppe der MMTV-induzierten, onkogenen *Wnt*-Gene zugeordnet. Weiterhin ist die Funktion von *Wnt2* schwierig einzuschätzen, da es bereits in der Mamma jungfräulicher Mäuse exprimiert wird. Da keines der onkogenen *Wnt*-Gene in physiologische Weise in der adulten Mamma exprimiert wird, könnte diese „de novo“ Expression eine Bedeutung für die Tumorigenese von Mammatumoren haben. Diese Vermutung wurde exemplarisch für *Wnt3a* *in vitro* und *in vivo* auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Mit *Wnt3a* transduzierte Mammaepithelzellen (HC11) zeigten eindeutig morphologische Veränderungen und ähnelten im Phänotyp Fibroblasten. Die Transformation der HC11-*Wnt3a*-Zellen konnte in einem Soft Agar Assay bestätigt werden, da nur transformierte Zellen nicht-adhärent wachsen und Kolonien ausbilden können. Die s.c. Injektion von BALB/c-nu/nu-Mäusen ergab keine histologischen Unterschiede zwischen der Leerkontrolle und den Zellen, die mit *Wnt3a* transduziert worden waren. Da das Tumorwachstum in den mit HC11-*Wnt3a* injizierten Mäusen jedoch um den Faktor 2,5 signifikant erhöht war, ist es wahrscheinlich, dass dieser Effekt auf die konstitutive Aktivierung von *Wnt3a* zurückzuführen ist. Somit kann *Wnt3a* wachstumsfördernd auf Mammaepithelzellen wirken und stellt daher ein Onkogen dar.

Ob *WNT3a* auch in humanen Brustkarzinomen exprimiert wird und hier unter Umständen auch als Onkogen wirksam ist, wurde mit einer quantitativen PCR ermittelt. Acht der 65 untersuchten Karzinome zeigten eine positive *WNT3a*-Expression, das normale Brustgewebe blieb negativ (5/5). Auch die hier vorgestellten Analysen legen eine mögliche Funktion von *WNT3a* bei der Bildung von Brusttumoren nahe. Erst weitere Untersuchungen werden zeigen, ob *WNT3a* die Tumorigenese in Brusttumoren induzieren kann oder ob ihm eine andere Rolle bei der Progression humaner Brustkarzinome zuteil kommt.

Literaturverzeichnis

1. Tavassoli, F.A., et al., *Images in pathology: the hearts of a breast pathologist, a hematopathologist, and of a cytotechnologist*. Int J Surg Pathol, 2002. **10**(4): p. 295.
2. Vlahakis, G., W.E. Heston, and G.H. Smith, *Strain C3H-A-vy-fB mice: ninety percent incidence of mammary tumors transmitted by either parent*. Science, 1970. **170**(954): p. 185-7.
3. Michalides, R., et al., *Characterization and chromosomal distribution of endogenous mouse mammary tumor viruses of European mouse strains STS/A and GR/A*. Virology, 1985. **142**(2): p. 278-90.
4. Callahan, R. and G.H. Smith, *MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways*. Oncogene, 2000. **19**(8): p. 992-1001.
5. Kozak, C., et al., *A standardized nomenclature for endogenous mouse mammary tumor viruses*. J Virol, 1987. **61**(5): p. 1651-4.
6. Smith, G.H., et al., *Suppression of spontaneous mammary tumorigenesis despite Mtv-1 gene expression in hybrid and backcross C3H-AvyfB X C3H/Sm mice*. Int J Cancer, 1982. **29**(5): p. 591-8.
7. Squartini, F., G. Rossi, and I. Paoletti, *Characters of mammary tumours in BALB/c female mice foster-nursed by C3H and RIII mothers*. Nature, 1963. **197**: p. 505-6.
8. Bentvelzen, P., *Host-virus interactions in murine mammary carcinogenesis*. Biochim Biophys Acta, 1974. **355**(3-4): p. 236-59.
9. Drohan, W., et al., *Isolation of the mouse mammary tumor virus sequences not transmitted as germinal provirus in the C3H and RIII mouse strains*. J Virol, 1977. **21**(3): p. 986-95.
10. Held, W., et al., *Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus*. Immunol Today, 1994. **15**(4): p. 184-90.
11. Tsubura, A., et al., *Intervention of T-cells in transportation of mouse mammary tumor virus (milk factor) to mammary gland cells in vivo*. Cancer Res, 1988. **48**(22): p. 6555-9.
12. Czarneski, J., J.C. Rassa, and S.R. Ross, *Mouse mammary tumor virus and the immune system*. Immunol Res, 2003. **27**(2-3): p. 469-80.
13. Uren, A.G., et al., *Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7656-72.
14. Jonkers, J. and A. Berns, *Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1287**(1): p. 29-57.
15. Coffin, J.M. and C. Moore, *Determination of 3' end processing in retroelements*. Trends Genet, 1990. **6**(9): p. 276-7.
16. Krimpenfort, P., et al., *Transcription of T cell receptor beta-chain genes is controlled by a downstream regulatory element*. Embo J, 1988. **7**(3): p. 745-50.

17. Berns, A., *Provirus tagging as an instrument to identify oncogenes and to establish synergism between oncogenes*. Arch Virol, 1988. **102**(1-2): p. 1-18.
18. Butturini, A., et al., *Oncogenes in human leukemias*. Acta Haematol, 1987. **78 Suppl 1**: p. 2-10.
19. Callahan, R., *Oncogenes and breast cancer progression*. Basic Life Sci, 1991. **57**: p. 143-53; discussion 153-6.
20. Nusse, R., *The activation of cellular oncogenes by proviral insertion in murine mammary cancer*. Cancer Treat Res, 1988. **40**: p. 283-306.
21. Nusse, R., *Insertional mutagenesis in mouse mammary tumorigenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1991. **171**: p. 43-65.
22. Willecke, K. and R. Schafer, *Human oncogenes*. Hum Genet, 1984. **66**(2-3): p. 132-42.
23. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*. Cell, 1982. **31**(1): p. 99-109.
24. Suzuki, T., et al., *New genes involved in cancer identified by retroviral tagging*. Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 166-74.
25. Lund, A.H., et al., *Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice*. Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 160-5.
26. Hilkens, J., *Recent translational research: Oncogene discovery by insertional mutagenesis gets a new boost*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(1): p. 102.
27. Wiedlocha, A. and V. Sorensen, *Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **286**: p. 45-79.
28. Clausse, N., et al., *Activation of both Wnt-1 and Fgf-3 by insertion of mouse mammary tumor virus downstream in the reverse orientation: a reappraisal of the enhancer insertion model*. Virology, 1993. **194**(1): p. 157-65.
29. Muskavitch, M.A., *Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice*. Dev Biol, 1994. **166**(2): p. 415-30.
30. Politi, K., N. Feirt, and J. Kitajewski, *Notch in mammary gland development and breast cancer*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(5): p. 341-7.
31. Peters, G., et al., *Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors*. Cell, 1983. **33**(2): p. 369-77.
32. Brookes, S., et al., *The mouse homologue of hst/k-FGF: sequence, genome organization and location relative to int-2*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(11): p. 4037-45.
33. MacArthur, C.A., D.B. Shankar, and G.M. Shackleford, *Fgf-8, activated by proviral insertion, cooperates with the Wnt-1 transgene in murine mammary tumorigenesis*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2501-7.
34. Theodorou, V., et al., *Fgf10 is an oncogene activated by MMTV insertional mutagenesis in mouse mammary tumors and overexpressed in a subset of human breast carcinomas*. Oncogene, 2004. **23**(36): p. 6047-55.

35. Gray, D.A., et al., *A common mouse mammary tumor virus integration site in chemically induced precancerous mammary hyperplasias*. Virology, 1986. **148**(2): p. 360-8.
36. Marchetti, A., et al., *Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1932-8.
37. Lowther, W., et al., *A new common integration site, Int7, for the mouse mammary tumor virus in mouse mammary tumors identifies a gene whose product has furin-like and thrombospondin-like sequences*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 10093-6.
38. Garcia, M., et al., *A new site of integration for mouse mammary tumor virus proviral DNA common to BALB/cf(C3H) mammary and kidney adenocarcinomas*. Embo J, 1986. **5**(1): p. 127-34.
39. Erny, K.M., et al., *Involvement of the Tpl-2/cot oncogene in MMTV tumorigenesis*. Oncogene, 1996. **13**(9): p. 2015-20.
40. Girard, L., et al., *Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis*. Genes Dev, 1996. **10**(15): p. 1930-44.
41. Gallahan, D. and R. Callahan, *Mammary tumorigenesis in feral mice: identification of a new int locus in mouse mammary tumor virus (Czech II)-induced mammary tumors*. J Virol, 1987. **61**(1): p. 66-74.
42. Roelink, H., et al., *Wnt-3, a gene activated by proviral insertion in mouse mammary tumors, is homologous to int-1/Wnt-1 and is normally expressed in mouse embryos and adult brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4519-23.
43. Lee, F.S., et al., *Insertional mutagenesis identifies a member of the Wnt gene family as a candidate oncogene in the mammary epithelium of int-2/Fgf-3 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 2268-72.
44. Rijsewijk, F., et al., *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. Cell, 1987. **50**(4): p. 649-57.
45. Brown, A.M., *Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle?* Breast Cancer Res, 2001. **3**(6): p. 351-5.
46. Peifer, M. and P. Polakis, *Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1606-9.
47. Brennan, K.R. and A.M. Brown, *Wnt proteins in mammary development and cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. **9**(2): p. 119-31.
48. Akiyama, T., *Wnt/beta-catenin signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(4): p. 273-82.
49. Arias, A.M., A.M. Brown, and K. Brennan, *Wnt signalling: pathway or network?* Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(4): p. 447-54.
50. Dale, T.C., *Signal transduction by the Wnt family of ligands*. Biochem J, 1998. **329** (Pt 2): p. 209-23.
51. Huelsken, J. and J. Behrens, *The Wnt signalling pathway*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 21): p. 3977-8.

52. Huelsken, J. and W. Birchmeier, *New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 547-53.
53. Kuhl, M., et al., *The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. Trends Genet, 2000. **16**(7): p. 279-83.
54. Miller, J.R., *The Wnts*. Genome Biol, 2002. **3**(1): p. REVIEWS3001.
55. Pandur, P., D. Maurus, and M. Kuhl, *Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network*. Bioessays, 2002. **24**(10): p. 881-4.
56. Povelones, M. and R. Nusse, *Wnt signalling sees spots*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(11): p. E249-50.
57. Sokol, S., *A role for Wnts in morpho-genesis and tissue polarity*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(7): p. E124-5.
58. Westfall, T.A., et al., *Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 889-98.
59. Andl, T., et al., *WNT signals are required for the initiation of hair follicle development*. Dev Cell, 2002. **2**(5): p. 643-53.
60. Chu, E.Y., et al., *Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis*. Development, 2004. **131**(19): p. 4819-29.
61. Robinson, G.W., A.B. Karpf, and K. Kratochwil, *Regulation of mammary gland development by tissue interaction*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1999. **4**(1): p. 9-19.
62. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 548-58.
63. Brabletz, T., et al., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. Cells Tissues Organs, 2005. **179**(1-2): p. 56-65.
64. Phippard, D.J., et al., *Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development*. Development, 1996. **122**(9): p. 2729-37.
65. Smalley, M.J. and T.C. Dale, *Wnt signaling and mammary tumorigenesis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. **6**(1): p. 37-52.
66. Tsukamoto, A.S., et al., *Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice*. Cell, 1988. **55**(4): p. 619-25.
67. Lane, T.F. and P. Leder, *Wnt-10b directs hypermorphic development and transformation in mammary glands of male and female mice*. Oncogene, 1997. **15**(18): p. 2133-44.
68. Kwan, H., et al., *Transgenes expressing the Wnt-1 and int-2 proto-oncogenes cooperate during mammary carcinogenesis in doubly transgenic mice*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(1): p. 147-54.
69. Shackelford, G.M., et al., *Mouse mammary tumor virus infection accelerates mammary carcinogenesis in Wnt-1 transgenic mice by insertional activation of int-2/Fgf-3 and hst/Fgf-4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 740-4.

70. Katoh, M., *Expression and regulation of WNT1 in human cancer: up-regulation of WNT1 by beta-estradiol in MCF-7 cells*. Int J Oncol, 2003. **22**(1): p. 209-12.
71. Katoh, M., *Regulation of WNT3 and WNT3A mRNAs in human cancer cell lines NT2, MCF-7, and MKN45*. Int J Oncol, 2002. **20**(2): p. 373-7.
72. Kirikoshi, H. and M. Katoh, *Expression and regulation of WNT10B in human cancer: up-regulation of WNT10B in MCF-7 cells by beta-estradiol and down-regulation of WNT10B in NT2 cells by retinoic acid*. Int J Mol Med, 2002. **10**(4): p. 507-11.
73. Kirikoshi, H. and M. Katoh, *Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer*. Int J Oncol, 2002. **21**(4): p. 895-900.
74. Saitoh, T. and M. Katoh, *Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells*. Int J Mol Med, 2002. **10**(3): p. 345-9.
75. Mai, M., et al., *Cloning of the human homolog of conductin (AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23-q24*. Genomics, 1999. **55**(3): p. 341-4.
76. Lustig, B. and J. Behrens, *The Wnt signaling pathway and its role in tumor development*. J Cancer Res Clin Oncol, 2003. **129**(4): p. 199-221.
77. Cottrell, S., et al., *Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas*. Lancet, 1992. **340**(8820): p. 626-30.
78. Lin, S.Y., et al., *Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4262-6.
79. Candidus, S., et al., *No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas*. Cancer Res, 1996. **56**(1): p. 49-52.
80. Pierceall, W.E., et al., *Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines*. Oncogene, 1995. **11**(7): p. 1319-26.
81. Ilyas, M. and I.P. Tomlinson, *The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression*. J Pathol, 1997. **182**(2): p. 128-37.
82. Barnes, D.M. and C.E. Gillett, *Cyclin D1 in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **52**(1-3): p. 1-15.
83. Danielson, K.G., et al., *Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3756-60.
84. Morling, F.J. and S.J. Russell, *Enhanced transduction efficiency of retroviral vectors coprecipitated with calcium phosphate*. Gene Ther, 1995. **2**(7): p. 504-8.
85. Corti, C., et al., *Spontaneous lung metastases in a human lung tumor xenograft: a new experimental model*. J Cancer Res Clin Oncol, 1996. **122**(3): p. 154-60.
86. Belardelli, F., et al., *Biologic and biochemical differences between in vitro and in vivo passaged Friend erythroleukemia cells. I. Tumorigenicity and capacity to metastasize*. Int J Cancer, 1984. **34**(3): p. 389-95.

87. Mikkers, H., et al., *High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer*. Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 153-9.
88. Devon, R.S., D.J. Porteous, and A.J. Brookes, *Splinkerettes--improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(9): p. 1644-5.
89. Nusse, R., et al., *Retroviral insertional mutagenesis in murine mammary cancer*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1985. **226**(1242): p. 3-13.
90. Wong, G.T., B.J. Gavin, and A.P. McMahon, *Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 6278-86.
91. Shimizu, H., et al., *Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(12): p. 1349-58.
92. Humphreys, R.C. and J.M. Rosen, *Stably transfected HC11 cells provide an in vitro and in vivo model system for studying Wnt gene function*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(8): p. 839-49.
93. Civenni, G., T. Holbro, and N.E. Hynes, *Wnt1 and Wnt5a induce cyclin D1 expression through ErbB1 transactivation in HC11 mammary epithelial cells*. EMBO Rep, 2003. **4**(2): p. 166-71.
94. Brandt, R., A.M. Wong, and N.E. Hynes, *Mammary glands reconstituted with Neu/ErbB2 transformed HC11 cells provide a novel orthotopic tumor model for testing anti-cancer agents*. Oncogene, 2001. **20**(39): p. 5459-65.
95. Roelink, H., E. Wagenaar, and R. Nusse, *Amplification and proviral activation of several Wnt genes during progression and clonal variation of mouse mammary tumors*. Oncogene, 1992. **7**(3): p. 487-92.
96. Sarkar, N.H., *Clonal variations among multiple primary mammary tumors and within a tumor of individual mice: insertion mutations of int oncogenes*. Virology, 1995. **212**(2): p. 490-9.
97. Bartholomew, C. and J.N. Ihle, *Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 1820-8.
98. Lammie, G.A., et al., *Proviral insertions near cyclin D1 in mouse lymphomas: a parallel for BCL1 translocations in human B-cell neoplasms*. Oncogene, 1992. **7**(12): p. 2381-7.
99. Lazo, P.A., J.S. Lee, and P.N. Tsichlis, *Long-distance activation of the Myc protooncogene by provirus insertion in Mlvi-1 or Mlvi-4 in rat T-cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 170-3.
100. Katoh, M., *Molecular cloning and characterization of human WNT3*. Int J Oncol, 2001. **19**(5): p. 977-82.
101. Welm, B.E., et al., *Inducible dimerization of FGFR1: development of a mouse model to analyze progressive transformation of the mammary gland*. J Cell Biol, 2002. **157**(4): p. 703-14.
102. Fioravanti, L., et al., *int-2 oncogene amplification and prognosis in node-negative breast carcinoma*. Int J Cancer, 1997. **74**(6): p. 620-4.

103. Hajitou, A., et al., *Progression in MCF-7 breast cancer cell tumorigenicity: compared effect of FGF-3 and FGF-4*. Breast Cancer Res Treat, 2000. **60**(1): p. 15-28.
104. Marsh, S.K., et al., *Increased expression of fibroblast growth factor 8 in human breast cancer*. Oncogene, 1999. **18**(4): p. 1053-60.
105. Carraway, K.L., 3rd and C. Sweeney, *Co-opted integrin signaling in ErbB2-induced mammary tumor progression*. Cancer Cell, 2006. **10**(2): p. 93-5.
106. O'Neill, K.L., M. Hoper, and G.W. Odling-Smee, *Can thymidine kinase levels in breast tumors predict disease recurrence?* J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(23): p. 1825-8.
107. Orend, G., *Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 1066-83.
108. Gold, B., et al., *Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 8891-900.
109. Amin, D.N., A.S. Perkins, and D.F. Stern, *Gene expression profiling of ErbB receptor and ligand-dependent transcription*. Oncogene, 2004. **23**(7): p. 1428-38.
110. Li, C., et al., *Cell type and culture condition-dependent alternative splicing in human breast cancer cells revealed by splicing-sensitive microarrays*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 1990-9.
111. Shatalova, E.G., et al., *Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(6): p. R909-21.
112. Merrell, M.A., et al., *Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(7): p. 437-47.
113. Liu, Y., H. Peng, and J.T. Zhang, *Expression profiling of ABC transporters in a drug-resistant breast cancer cell line using AmpArray*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(2): p. 430-8.
114. Yared, M.A., et al., *Expression of c-kit proto-oncogene product in breast tissue*. Breast J, 2004. **10**(4): p. 323-7.
115. Johannsdottir, H.K., et al., *Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors*. Int J Cancer, 2006. **119**(5): p. 1052-60.
116. Deng, Q. and S. Huang, *PRDM5 is silenced in human cancers and has growth suppressive activities*. Oncogene, 2004. **23**(28): p. 4903-10.
117. Yamaguchi, H., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 3): p. 715-22.
118. Mazzocchi, G., et al., *Adrenomedullin (AM) and AM receptor type 2 expression is up-regulated in prostate carcinomas (PC), and AM stimulates in vitro growth of a PC-derived cell line by enhancing proliferation and decreasing apoptosis rates*. Int J Oncol, 2004. **25**(6): p. 1781-7.
119. Nagayama, S., et al., *Therapeutic potential of antibodies against FZD 10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas*. Oncogene, 2005. **24**(41): p. 6201-12.

120. Ito, K., et al., *Initial expression of interferon alpha receptor 2 (IFNAR2) on CD34-positive cells and its down-regulation correlate with clinical response to interferon therapy in chronic myelogenous leukemia*. Eur J Haematol, 2004. **73**(3): p. 191-205.
121. Schmidt, H.H., et al., *Deregulation of the carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11 (CHST11) gene in a B-cell chronic lymphocytic leukemia with a t(12;14)(q23;q32)*. Oncogene, 2004. **23**(41): p. 6991-6.
122. Yoneda-Kato, N., et al., *Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3*. Embo J, 2005. **24**(9): p. 1739-49.
123. Horn, E.J., et al., *RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties*. Carcinogenesis, 2004. **25**(2): p. 157-67.
124. Pedersen, N., et al., *Transcriptional gene expression profiling of small cell lung cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1943-53.
125. Edwards, S., et al., *Expression analysis onto microarrays of randomly selected cDNA clones highlights HOXB13 as a marker of human prostate cancer*. Br J Cancer, 2005. **92**(2): p. 376-81.
126. Yokota, N., et al., *Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization*. Oncogene, 2004. **23**(19): p. 3444-53.
127. Nakada, M., et al., *Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3364-9.
128. Eschrich, S., et al., *Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3526-35.
129. Olsen, C.L., et al., *Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors*. BMC Cancer, 2004. **4**: p. 43.
130. Huang, Y., et al., *Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15044-9.
131. Yu, L., et al., *Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia*. Nat Genet, 2005. **37**(3): p. 265-74.
132. Gavin, B.J. and A.P. McMahon, *Differential regulation of the Wnt gene family during pregnancy and lactation suggests a role in postnatal development of the mammary gland*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(5): p. 2418-23.
133. Huguet, E.L., et al., *Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue*. Cancer Res, 1994. **54**(10): p. 2615-21.
134. Smalley, M.J. and T.C. Dale, *Wnt signalling in mammalian development and cancer*. Cancer Metastasis Rev, 1999. **18**(2): p. 215-30.

135. Weber-Hall, S.J., et al., *Developmental and hormonal regulation of Wnt gene expression in the mouse mammary gland*. Differentiation, 1994. **57**(3): p. 205-14.
136. Heikkila, M., H. Peltoketo, and S. Vainio, *Wnts and the female reproductive system*. J Exp Zool, 2001. **290**(6): p. 616-23.
137. Verras, M., et al., *Wnt3a growth factor induces androgen receptor-mediated transcription and enhances cell growth in human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 8860-6.
138. Young, C.S., et al., *Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2474-85.
139. McMahon, A.P., et al., *The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum*. Cell, 1992. **69**(4): p. 581-95.
140. Du, S.J., et al., *Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2625-34.
141. Torres, M.A., et al., *Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development*. J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1123-37.
142. Derksen, P.W., et al., *Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6122-7.
143. Dravid, G., et al., *Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2005. **23**(10): p. 1489-501.
144. Shibamoto, S., et al., *Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling*. Genes Cells, 1998. **3**(10): p. 659-70.
145. Vincent-Salomon, A. and J.P. Thiery, *Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(2): p. 101-6.
146. McKeown, S.J., et al., *Sox10 overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation*. Dev Dyn, 2005. **233**(2): p. 430-44.
147. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-14.
148. Dontu, G. and M.S. Wicha, *Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005. **10**(1): p. 75-86.
149. Smalley, M. and A. Ashworth, *Stem cells and breast cancer: A field in transit*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 832-44.
150. Chiba, S., *Notch signaling in stem cell systems*. Stem Cells, 2006.

151. Dvorak, P., D. Dvorakova, and A. Hampl, *Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2869-74.
152. Neth, P., et al., *Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(8): p. 1892-903.
153. Ross, J. and L. Li, *Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(4): p. 237-42.
154. Chamorro, M.N., et al., *FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development*. Embo J, 2005. **24**(1): p. 73-84.
155. Ciruna, B. and J. Rossant, *FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak*. Dev Cell, 2001. **1**(1): p. 37-49.
156. Eblaghie, M.C., et al., *Interactions between FGF and Wnt signals and Tbx3 gene expression in mammary gland initiation in mouse embryos*. J Anat, 2004. **205**(1): p. 1-13.
157. Moon, R.T., J.D. Brown, and M. Torres, *WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development*. Trends Genet, 1997. **13**(4): p. 157-62.
158. Tekmal, R.R. and N. Keshava, *Role of MMTV integration locus cellular genes in breast cancer*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d519-26.
159. Veltmaat, J.M., et al., *Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression*. Dev Dyn, 2004. **229**(2): p. 349-56.
160. Saiga, T., et al., *Comparison of the colony forming ability and invasive potential of six primate cell lines treated with retinoic acid*. Invest New Drugs, 1986. **4**(1): p. 25-9.
161. Van de Vijver, M.J. and R. Nusse, *The molecular biology of breast cancer*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(1): p. 33-50.
162. Bergstein, I., et al., *Investigation of the possible role of WNT genes in human breast cancer*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **768**: p. 257.
163. Bui, T.D., et al., *A novel human Wnt gene, WNT10B, maps to 12q13 and is expressed in human breast carcinomas*. Oncogene, 1997. **14**(10): p. 1249-53.
164. Dale, T.C., et al., *Compartment switching of WNT-2 expression in human breast tumors*. Cancer Res, 1996. **56**(19): p. 4320-3.
165. Lejeune, S., et al., *Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(2): p. 215-22.
166. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit- einschließlich Tabellen und Abbildungen- die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt wurde; dass sie -abgesehen von den angegeben Teilpublikationen- noch nicht veröffentlicht ist.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

München, den 28. 08. 2006

Melanie Kimm

Lebenslauf

Melanie Alexandra Kimm
geboren am 17.01.1972
in München

1983-1993	Besuch des Ignatz-Taschner-Gymnasiums in Dachau
1993	Allgemeine Hochschulreife
1993-1997	Grundstudium der Biologie an der Ludwig-Maximilians Universität in München
1997	Vordiplom in Biologie
1997-1999	Hauptstudium der Biologie an der Ludwig-Maximilians Universität in München
1999	Diplom-Hauptprüfung
1999-2000	Diplomarbeit bei Prof. Dr. M. Klingler am Zoologischen Institut der LMU München
2000-2006	Promotion bei Dr. J. Hilkens am NKI, Amsterdam und PD Dr. C. Klein am Immunologischen Institut der LMU, München
2007	Rigorosum